

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Análisis de la función del supresor tumoral ING1
en senescencia celular**

María Abad Méndez

Madrid, 2008

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Análisis de la función del supresor tumoral ING1 en senescencia celular

María Abad Méndez
Licenciada en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dr. Ignacio Palmero Rodríguez

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”
CSIC-UAM



MINISTERIO
DE CIENCIA E
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

Ignacio Palmero, PhD
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Arturo Duperier, 4.
E-28029 Madrid, SPAIN
Tel: 34 91 585 4491
Fax: 34 91 585 4401
email: ipalmero@iib.uam.es

IGNACIO PALMERO RODRÍGUEZ, Científico Titular del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, y Profesor Honorario del Departamento de Bioquímica de la UAM,

certifico que:

MARÍA ABAD MÉNDEZ, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado:

"Análisis de la función del supresor tumoral ING1 en senescencia celular"

Considero, además, que el mencionado trabajo reúne la originalidad y calidad científica requeridas para poder ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado,

En Madrid, a 30 de octubre de 2008.

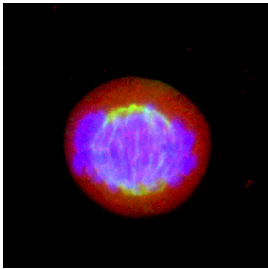
Fdo: Ignacio Palmero

C/Arturo Duperier, nº 4
28029 MADRID
ESPAÑA
TEL. 91 585 4400
FAX: 91 585 4401

A mis padres

La frase mas excitante que se puede oir en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino "Es extraño ..."

Isaac Asimov.



Agradecimientos

Es en el momento que haces clic sobre el icono de “guardar”, y queda finalizada la última (¡quizá no!) versión de la tesis, cuando a uno le invade esa sensación de inquietud, alegría y a la vez tristeza, que acompaña a todo final de una gran etapa. Y ésta, sin duda, lo ha sido. Una etapa de crecimiento personal, de ponerse a prueba y conocerse mejor. Una etapa que finalizo cargada de buenos momentos, de muchas satisfacciones, de por qué no, algunas decepciones, de miles de risas, carcajadas, momentos de ilusión, y también momentos difíciles... Han sido unos años realmente intensos, marcados por la gente que me ha acompañado durante todo este tiempo, y de la que tanto he aprendido, a nivel profesional y personal. Quería mostrar mi agradecimiento a todas las personas que, de una manera u otra, han hecho posible que estos años de tesis hayan sido una experiencia estupenda.

Quería dar las gracias en primer lugar a Ignacio Palmero. Por darme la oportunidad de entrar en el laboratorio y confiar en mí para realizar este proyecto. Gracias por tu dedicación, por estar siempre dispuesto a escucharme, por tener en cuenta mis ideas y opiniones. Gracias por todas esas reuniones en las que he aprendido tanto, en las que no mirabas el reloj. Gracias por darme la libertad necesaria para aprender equivocándome. Gracias por saber motivarme, y enseñarme a disfrutar con este trabajo. En definitiva, gracias por ser un jefe estupendo, es muy difícil crecer sin buenos maestros.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, a todos los que han formado parte del 1.4., y que han hecho que sea un grupo donde lo difícil se hace más fácil. A los que ya no están, Julieta, Pilar, Natacha, Iván, Juan, Andrea, Flopy, Laura, Alicia, Agatha...por dejar cada uno su huellita, porque de todos he aprendido. Un abrazo especial a Esther, por demostrar siempre cariño de una forma tan especial, y saber mantenerlo en la distancia; a Ana, ese torbellino con el que es imposible no encariñarse, gracias por toda la energía que transmites, por tus lecciones de vida; a Gloria, porque siempre te has preocupado por mí, por muy lejos que estés. A Lara, con la que empecé en el 1.4.1. cuando sólo había unas cuantas botellas sobre las estanterías. Por todos los años de amistad fuera y dentro del labo, por tu incondicional apoyo, por cuidar de mí siempre; te echo mucho de menos, guapa.

A los que todavía siguen aquí: Camino, que trabajó mano a mano conmigo durante la “era *gene-trap*”, gracias por superar los momentos difíciles que trajo esta época, y disfrutar de todos los buenos. Gracias por tu atenta escucha, por tu ternura, por tu disposición a ayudar, por haber aprendido a leer mis ojos...Gracias! Dani, con esa fuerza y empuje que tienes me has ayudado mucho, tanto en los temas del labo como en los personales, gracias por compartir conmigo tantas conversaciones, tantos debates, por ayudarme a salir de mis pozos...por aportar muchas veces el punto de vista necesario para poder afrontar los problemas. Has sido un gran apoyo, sobre todo en la última etapa. Alberto, ¡mi pequeño lechón! Desde que apareciste en el labo me ganaste, y lo

sabes (je, je). Gracias por tu frescura, por tu sentido del humor, por la sonrisa perpetua... por ser, ante todo, una gran persona, con la que se puede contar. Gracias por sentirte cerquita siempre, ya sea con post-it, e-mails o cartas de "true-love".

A mis niñas del 1.4.2., por ser esa chispita que hace que me cueste tanto pasar página. Bárbara, gracias por demostrarme día a día tu amistad, por las pequeñas y grandes cosas que me han unido a ti, por todas las aventurillas que hemos pasado juntas, por dejarme disfrutar de esa "locura" que te hace ser tan especial, y que me hace siempre sonreír. Eres un modelo de tesón y trabajo que admiro, ¡vales mucho!. A Leti, "mi pilinroja". Desde que nos destrozamos el pulgar con las ES no nos hemos separado, y es que no concibo toda esta etapa sin ti, pequeña. Gracias por estar a mi lado, por ayudarme siempre, por todas las risas y las lágrimas compartidas, por conocerme, y quererme. No te imaginas lo que te voy a echar de menos.

A las personas que se han unido al grupo del 1.4., como Gema, gracias por todos tus consejos, por saber escuchar; y Esther (para mi siempre serás Pili), ¡cómo se puede tener tanto cariño a una cosa tan pequeña! Todavía no sé cómo me has aguantado este verano, pero mil gracias, no sabes todo lo que me has ayudado, eres genial.

Carmela, gracias por todo el interés que has mostrado siempre hacia mí, y hacia mi formación, por tus críticas, tus propuestas, por todos tus consejos; gracias por el ánimo y entusiasmo que me has transmitido cuando más lo necesitaba. Gracias por abrirme los ojos tantas veces, gracias de corazón.

Por otro lado, me gustaría mencionar a todas las personas de este instituto (por suerte muchas) que me han ayudado durante esta etapa. A Merche, por ser indudablemente un apoyo, al que siempre he sabido que podía acudir. Por todas nuestras conversaciones, por tu sinceridad, por hacerte querer. A Antonio, por arrancarme tantas sonrisas, y por todos tus consejillos, técnicos y sobre cualquier otra cosa. A Edel, porque sin duda, ¡eres único!, ha sido un placer tenerte como compi, de inglés y de biblio, mucho ánimo. A la gente de los laboratorios 2.4.1. y 2.4.2., por los seminarios, cumpleaños, salidas, fiestas...por hacer que todo esto sea más divertido. Y en general, a todos aquellos que ya sea en cultivos, en vuestros labos, o en los pasillos, me habéis ayudado a sentir mejor, a Toño, Jose, Ana, Eva, Marta, Noe, Patri, Marta, Irene, Pablo...

A Javi, Antonio, y Ricardo, de Imagen, por siempre estar dispuestos a ayudar, por vuestra infinita paciencia, ¡sobre todo en los momentos de crisis!.

A los chicos de Informática, Javi, Guti, Nani, por esa mano que me ha sacado tantas veces de apuros, pero sobre todo por vuestros mimos, vuestro interés... por hacer que me apeteciera pasar por informática porque eso suponía un buen rato. Gracias por vuestra amistad.

A mis amigos de la facultad, con los que me inicié en esta aventura, y tengo la suerte de conservar. Porque habéis formado también parte de esto, con vuestra ayuda, ya sea comentando alguna técnica, debatiendo nuestros proyectos, algún que otro reactivo...pero sobre todo porque

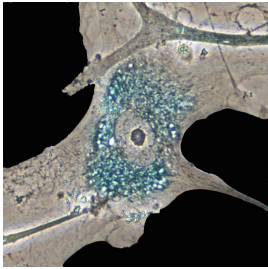
en las situaciones difíciles habéis respondido como buenos amigos. Menchu, por estar de forma incondicional, por tu cariño y apoyo; Mónica, ¡por conocerme mejor que yo misma! Sin duda no sé que habría hecho yo sin ti en tantas ocasiones; Pablo, por tus consejos, tus abrazos, por fomentar el seguir viéndonos; Vicen, por ser el primero con el que compartí una pipeta!. Por todo lo que aprendo junto a tí, y de tí; Silvia, porque aunque estés muy lejos sigues preocupándote por mí; Guada, un guiño especial, por compartir conmigo la etapa de escritura, y las llamadas ante los ataques de pánico, en las que aconseguías que acabara riéndome; Pablo Piercing, por quererme de esa forma tan especial, por demostrarme que te importo; Jorchi, por esas noches de biblioteca sin dormir, madre mía!... a Pumu, Ana, Clara, Alfredo...sois muchos a los que agradecer tantas cosas...

A mis amigas de siempre, Raquel y Esther, porque desde un mundo tan ajeno a este me habéis sabido comprender, y apoyar. Porque aunque os lo diga poco, me enseñáis mucho, con esa fuerza y poder de lucha con el que os enfrentais a todos los problemas. Gracias.

Por supuesto, gracias a mi familia: A mis abuelos, por ser esa fuente tan grande de cariño, por vuestra dedicación, por enseñarme tantas cosas, por el calor que he sentido siempre a vuestro lado. A “Manolito el bien hecho”, porque siempre se preocupó mucho por mi formación y no pudo ver terminada esta tesis. A mis hermanos, Ana y Nacho, por todos los abrazos y achuchones que tanto necesito, por el interés que habeis mostrado por mi trabajo, y vuestro esfuerzo en entenderlo, por quererme tanto, y demostrármelo.

A mis padres. Nunca podré compensar tanto esfuerzo, dedicación, y cariño. Gracias por estar a mi lado de forma incondicional, por hacerme sentir tan arropada. Por vuestro empeño en mi educación, por saber motivarme e ilusionarme con mis metas, por impulsarme siempre a conseguirlas. Por haberme permitido aprender tanto de vosotros, por todo lo que me seguís enseñando. Por la conversación tras cada jornada, por saber escucharme, y aconsejarme. Por todos vuestros mimos, todos vuestros cuidados, por quererme así...Gracias. Sois los padres que todo el mundo querría tener.

Por último, gracias Angel. Por tu paciencia, por tu comprensión, por todas las esperas tras la puerta de cultivos para vernos un rato...Por transmitirme tanta pasión por la ciencia, por todos los debates, conversaciones y divagaciones que me han ayudado tanto en este trabajo. Pero sobre todo gracias por tu apoyo, por hacerme sonreír en los momento difíciles, por celebrar conmigo los buenos momentos. Gracias por estar siempre a mi lado, por no soltar mi mano. ¡Seiscientas veces gracias!.



Resumen

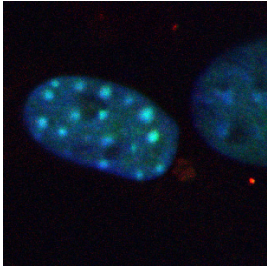
La senescencia celular constituye un mecanismo de supresión tumoral, a través del cual células con alteraciones potencialmente oncogénicas entran en un estado estable de no proliferación, impidiendo que las mismas prosigan en su camino hacia la formación de un tumor. Este proceso está gobernado por las vías de p53 y Rb, y se encuentra regulado epigenéticamente, implicando procesos de remodelación de cromatina. La importancia de esta barrera antitumoral se ha puesto de manifiesto tanto *in vitro*, como *in vivo*.

ING1b es el miembro mejor caracterizado de La familia ING, que agrupa un conjunto de proteínas conservadas durante la evolución implicadas en procesos de supresión tumoral. En el caso de ING1b, se ha demostrado su participación en regulación de la proliferación celular, reparación de daño en ADN y apoptosis, y se han descrito alteraciones del locus *ING1* en multitud de tumores humanos, por lo que ING1b es considerado como un supresor tumoral. ING1b ejerce sus funciones en conexión con la vía de p53 y la maquinaria de remodelación de cromatina.

Con estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos determinar el posible papel de ING1b en senescencia celular. Hemos demostrado que ING1b induce senescencia celular en fibroblastos primarios humanos, de forma dependiente de p53. Además, ING1b es necesario para la respuesta antiproliferativa a estrés oncogénico en estas células. Para determinar la importancia de esta proteína *in vivo*, hemos utilizado un modelo de ratón en el que el locus *Ing1* ha sido inactivado por la inserción de un casete gene-trap, produciendo una disminución dramática de los niveles proteicos de ING1b. Los fibroblastos procedentes de estos ratones tienen comprometida la inducción de senescencia por estrés oncogénico, con inducción deficiente de p53.

Por otro lado, quisimos explorar el papel de ING1b en regulación de cromatina y represión transcripcional en el contexto de senescencia. Hemos visto que los MEFs deficientes en *Ing1* tienen un defecto en formación de heterocromatina tras la expresión de Ras V12. En fibroblastos humanos, ING1b induce SAHFs, estructuras funcionales de heterocromatina asociadas a represión génica durante senescencia. Usando mutantes de delección o puntuales de la proteína, hemos comprobado que la capacidad de ING1b de inducir senescencia correlaciona con su capacidad de represión transcripcional, y requiere el reconocimiento de marcas específicas de histonas.

Nuestros datos demuestran que ING1b es un importante regulador de senescencia celular en fibroblastos primarios humanos y de ratón, en conexión con la vía de p53 y remodelación de cromatina. Además, nuestras observaciones contribuyen a avanzar en el conocimiento de las funciones y mecanismos de actuación de ING1b en supresión tumoral, y de un punto de vista más general más, a un mejor entendimiento de los procesos que dan lugar a la respuesta de senescencia celular.



Abstract

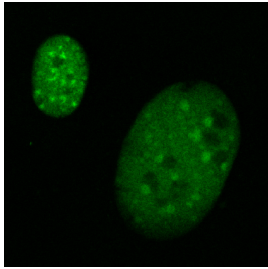
Cellular senescence is a tumor suppression mechanism, through which cells with potentially oncogenic alterations enter a stable state of no proliferation, preventing them to continue towards tumor formation. This process is governed by the Rb and p53 pathways, and is epigenetically regulated, involving processes of chromatin remodeling. The importance of this anti-tumor barrier has been demonstrated both *in vitro* and *in vivo*.

ING1b is the best characterized member of the ING family of proteins, which includes several evolutionary conserved proteins involved in tumor suppression processes. ING1b has been connected with regulation of cell proliferation, repair of DNA damage and apoptosis, and alterations in the *ING1* locus have been described in several human tumors, so ING1b is considered as a suppressor tumor protein. ING1b carry out its functions in connection with the p53 pathway and the chromatin remodelling machinery.

With this background, we wanted to determine the possible role of ING1b in cellular senescence. We have shown that ING1b can induce cellular senescence in primary human fibroblasts, in a p53 dependent manner. In addition, ING1b is required for the antiproliferative response to oncogenic stress in these cells. To determine the importance of this protein *in vivo*, we used a mouse model in which the *Ing1* locus has been inactivated by the insertion of a gene-trap cassette, producing a dramatic decrease in the ING1b protein levels. *Ing1* deficient fibroblasts display an impaired response to oncogenic stress, losing the induction of p53 and evading the entry into cellular senescence after the expression of Ras V12.

In addition, we wanted to explore the role of ING1b in chromatin regulation and transcriptional repression in the context of senescence. *Ing1* deficient fibroblasts have a defect in heterochromatin formation following the expression of Ras V12. In human fibroblasts, ING1b induces SAHFs, functional structures of heterochromatin associated with transcriptional repression during senescence. Using deletion and point mutants of the protein, we found that the ability of ING1b to induce senescence correlates with its ability to repress transcription, and requires the binding of specific chromatin marks.

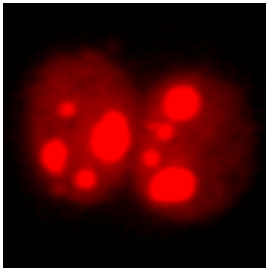
Our data show that ING1b is an important regulator of cellular senescence in primary human and mouse fibroblasts, in connection with the p53 pathway and chromatin regulation. Moreover, our findings contribute to the understanding of the role and way of action of ING1b in tumor suppression, and from a more general point of view, to a better understanding of the processes that give rise to the cellular senescence response.



Índice

Agradecimientos	III
Resumen	IX
Abstract	XIII
Índice	3
Clave de Abreviaturas	7
Introducción	11
1. Senescencia Celular	11
1.1. El fenotipo senescente	12
1.2. Inducción de senescencia	13
1.2.1. Senescencia replicativa	13
1.2.2. Senescencia prematura	14
Senescencia inducida por estrés oncogénico	14
Senescencia inducida por daño en el ADN	15
1.3. Senescencia y cromatina	16
1.4. p53 y Rb	18
1.4.1. Reguladores de p53 y Rb: El locus INK4A/ARF	20
2. La familia de proteínas ING	21
2.1. ING1b	22
2.1.1. Estructura y localización	22
2.1.2. Funciones biológicas de ING1b	24
2.1.3. ING1b y cromatina	25
2.1.4. Regulación de ING1b	27
Objetivos	31
Materiales y Métodos	35
1. Generación de ratones <i>gene-trap</i> para el locus <i>Ing1</i>	35
2. Cultivos celulares	35
3. Infección retroviral	35
4. Ensayos de formación de colonias	36
5. Curvas de crecimiento	36
6. Protocolo de pases seriados 3T3	36
7. Ensayo de actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia	37

8. Determinación de la tasa de síntesis de ADN	37
9. Inmunofluorescencia	37
10. Inmunoblot o <i>Western blot</i>	38
11. RT-PCR y PCR cuantitativa	38
12. Ensayo de tumorigénesis en ratones	39
13. Vectores de expresión	39
14. Anticuerpos	41
Resultados	45
1. ING1b y senescencia celular en fibroblastos humanos	45
1.1. ING1b induce senescencia en fibroblastos primarios humanos	45
1.2. ING1b induce senescencia celular de forma dependiente de p53	47
1.3. Los niveles de ING1b endógeno aumentan durante la senescencia inducida por estrés oncogénico	48
1.4. ING1b es necesario para la entrada en senescencia inducida por estrés oncogénico	50
2. Papel de Ing1 en senescencia en fibroblastos primarios de ratón	52
2.1. Caracterización de un modelo animal de deficiencia en <i>Ing1</i>	52
2.2. Los MEFs deficientes en <i>Ing1</i> tienen alterada la inducción de senescencia en respuesta a Ras oncogénico	54
3. Conexión entre ING1 y cromatina durante senescencia celular	59
3.1. La capacidad de ING1b de inducir parada de ciclo se relaciona con su capacidad de represión transcripcional	59
3.2. La unión de ING1b a H3K4 trimetilada es necesaria para la inducción de senescencia	61
3.3. ING1b participa en la formación de heterocromatina durante la entrada en senescencia	64
3.4. ING1b y respuesta a daño en el ADN	67
Discusión	71
Conclusiones	83
Bibliografía	87
Anexos	103



Clave de Abreviaturas

4-OHT: 4-Hidroxitamoxifeno

ARNm: ARN mensajero

BrdU: Bromodesoxiuridina

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

DDR: Respuesta a daño en el ADN (*DNA Damage Response*)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

FCS: Suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*)

H3K4Me3: Histona H3 trimetilada en lisina 4

H3K9Me3: Histona H3 trimetilada en la lisina 9

HATs: Histona acetil-transferasas

HDACs: Histona deacetilasas

HP1: Proteína de heterocromatina 1 (*Heterochromatin Protein-1*)

ING: Inhibidor de crecimiento (*Inhibitor of Growth*)

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblasts*)

miRNA: micro ARN

NCR: Nueva región conservada (*Novel Conserved Region*)

NLS: Secuencia de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence*)

PBR: Región polibásica (*Polibasic Region*)

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

PHD: *Plant Homeo Domain*

PIP: Dominio de interacción con PCNA (*PCNA Interacting Protein Motif*)

PIPs: Fosfoinosítidos fosfato (*Phosphoinositide Phosphates*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

SAHFs: Focos de heterocromatina asociados a senescencia (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*)

SA- β -Gal: Actividad β -Gal asociada a senescencia (*Senescence Associated β -Gal Activity*)

shRNA: Horquillas pequeñas de ARN (*Short Hairpin RNA*)

UV: Ultravioleta

wt: Silvestre (wild type)



Introducción

El cáncer aparece como consecuencia de la acumulación gradual de modificaciones genéticas que dañan los circuitos que gobiernan la homeostasis celular. Las células están sometidas continuamente a estímulos potencialmente oncogénicos, ya sean ambientales o procedentes del interior de la célula. La evolución ha dotado a las células de mamíferos de mecanismos de protección ante estos estímulos, que impiden la progresión de células alteradas hacia la formación de un tumor. El fallo de estos mecanismos, y la consiguiente pérdida de la barrera antitumoral, son requisitos para la transformación neoplásica (Hanahan and Weinberg, 2000; Hahn and Weinberg, 2002). Entre los mecanismos de supresión tumoral, juegan un papel destacado la muerte celular programada (o apoptosis) y la senescencia celular, a través de los cuales las células dañadas se eliminan, o se mantienen vivas pero sin capacidad de proliferar (Lowe et al., 2004).

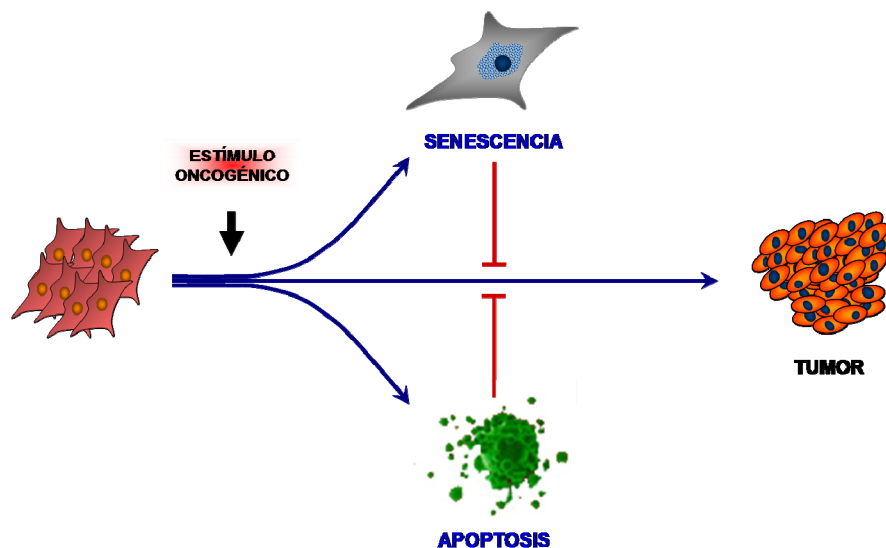


Figura 1. Principales mecanismos de supresión tumoral.

1. Senescencia Celular

La senescencia celular fue descrita por primera vez en 1961 por Hayflick y Moorhead, como una parada estable del ciclo celular asociada a la capacidad de proliferación limitada que muestran los fibroblastos en cultivo. Estos autores observaron que fibroblastos embrionarios humanos eran capaces de dividirse un número determinado de veces, tras el cual cesaban su proliferación y entraban en un estado al que denominaron senescencia (Hayflick and Moorhead, 1961). Las células senescentes, sin embargo, son viables y permanecen metabólicamente activas.

Hoy en día, la senescencia celular es considerada como una respuesta a estrés, desencadenada por diversos estímulos intracelulares o ambientales. Aunque la senescencia “replicativa” caracterizada por Hayflick se dispara por acortamiento telomérico debido a la acumulación de divisiones, un fenotipo idéntico llamado senescencia prematura o “stasis” se produce como consecuencia de la activación de oncogenes, daño en el ADN, estrés oxidativo y determinadas condiciones de cultivo (Sherr and DePinho, 2000; Campisi, 2003).

Si bien la senescencia celular se ha caracterizado en detalle como un fenómeno de células primarias en cultivo, recientemente se han obtenido numerosas evidencias en distintos procesos de tumorigénesis que sugieren que la senescencia prematura juega un importante papel como mecanismo de supresión tumoral *in vivo* (revisado en Collado et al., 2007; Courtois-Cox et al., 2008).

Además de su papel en supresión tumoral, se ha propuesto que la senescencia puede tener también un papel en envejecimiento. Se han planteado dos posibles mecanismos, quizás no excluyentes. Por un lado, la acumulación de células senescentes con la edad supone la secreción de determinadas proteínas que alteran el microentorno celular, y pueden comprometer la integridad y funcionalidad de los tejidos. Por otro, la senescencia puede limitar el potencial regenerativo de las células madre adultas, resultando en una alteración de la homeostasis de los tejidos y, como consecuencia, en envejecimiento (revisado en Collado et al., 2007).

1.1. El fenotipo senescente

La característica más definitoria de las células senescentes es su incapacidad de proliferar, y de forma opuesta a la quiescencia, esta parada es en esencia irreversible, ya que no responden a estímulos mitogénicos fisiológicos. Normalmente las células senescentes paran su ciclo con un contenido de ADN típico de fase G1, pero las características de la parada dependen del tipo y contexto celular. Así, se sabe que algunos oncogenes inducen senescencia con parada en G2, y algunas células tumorales senescen en fase G2 o S (revisado en Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Aunque no se dividen, las células senescentes son viables y permanecen metabólicamente activas, adoptando una morfología extendida y plana, y presentando un aumento de la vacuolización y un núcleo agrandado. Además, frecuentemente se encuentran multinucleadas y con un gran número de nucleolos.

Aparte de los cambios morfológicos, el marcador de senescencia más conocido es la actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal, *Senescence-Associated β -*

Galactosidase Activity) (Dimri et al., 1995). Este marcador es detectable mediante tinción histoquímica en la mayoría de las células senescentes, y proviene de la actividad β -Galactosidasa lisosomal, reflejando probablemente el exceso de biogénesis de lisosomas que ocurre en las células senescentes. Además, existen otros marcadores de senescencia como el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI1), y más recientemente, se han identificado las proteínas p15INK4b, DcR2, y DEC1 como marcadores de senescencia *in vivo* e *in vitro* (revisado en Collado and Serrano, 2006).

Las células senescentes desarrollan un programa específico de expresión génica, que incluye cambios en la expresión de activadores o inhibidores de ciclo celular. Entre los reguladores negativos que se expresan en células senescentes se encuentran los inhibidores de CDKs p21 (también denominado CDKN1A, p21CIP1, WAF1 o SDI1) y p16 (también CDKN2A o p16INK4A), y la proteína ARF (p14ARF en humanos, p19ARF en ratón). A su vez, estos reguladores de ciclo son efectores de las vías de supresión tumoral de p53 y Retinoblastoma (Rb), vías esenciales para la adquisición y el mantenimiento del fenotipo senescente. En las células senescentes también se encuentran reprimidos genes que codifican proteínas activadoras de ciclo celular, como c-FOS, ciclina A, ciclina B, y PCNA (Seshadri and Campisi, 1990; Pang and Chen, 1994; Narita et al., 2003). Además, son características la expresión y secreción de proteínas relacionadas con inflamación como la Interleuquina 1, y con la matriz extracelular, como la inducción de la Metaloproteasa 3 (MMP3) y la Colagenasa, o el descenso en los niveles del inhibidor tisular de la Metaloproteasa 1 (TIMP1) (revisado en Collado and Serrano, 2006).

También, se ha descrito que, en algunos casos, las células senescentes pueden mostrar resistencia a apoptosis, aunque el mecanismo a través del cual adquieren esta propiedad no se conoce bien (revisado en Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Así, se puede decir que el fenotipo senescente comprende una parada de ciclo celular, que se acompaña de cambios en la morfología, un programa específico de expresión génica y, en muchos casos, resistencia a la apoptosis.

1.2. Inducción de senescencia

1.2.1. Senescencia replicativa

Hayflick observó que los fibroblastos humanos en cultivo eran capaces de sufrir un número limitado de divisiones antes de entrar en senescencia. Este tipo de senescencia, senescencia replicativa, hoy se sabe que se debe a la pérdida de integridad de los telómeros.

Los telómeros consisten en secuencias repetidas de ADN localizadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos, que contribuyen a mantener la estabilidad genómica protegiendo a los cromosomas de degradación y recombinación (Chan et al., 2001; de Lange, 2005). Debido a que la ADN polimerasa no es capaz de copiar los extremos de las moléculas de ADN, los telómeros se acortan con cada división celular (Blasco, 2005). Cuando llegan a ser demasiado cortos, se produce una respuesta de daño a ADN (DDR, *DNA Damage Response*), en concreto una señal de rotura de doble cadena que, a través de la activación de p53, desencadena la entrada en senescencia. De acuerdo con esto, se sabe que se necesita una maquinaria de respuesta a daño en el ADN intacta para que se lleve a cabo la senescencia replicativa (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004).

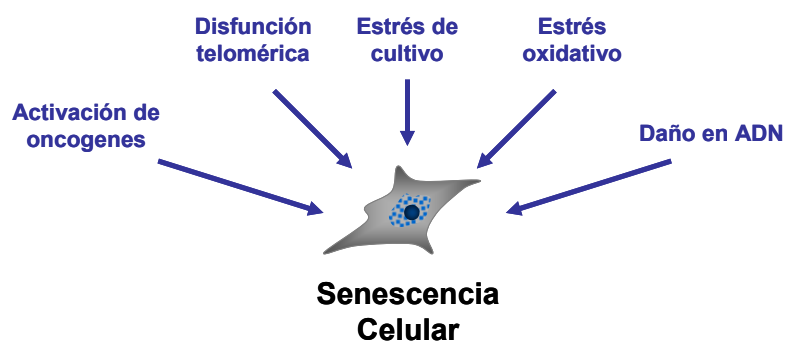


Figura 2. Distintos estímulos son capaces de inducir senescencia celular.

1.2.2. Senescencia prematura.

Aunque inicialmente se describió la senescencia como un fenotipo asociado a la acumulación de divisiones (senescencia replicativa), posteriormente se ha demostrado que también puede ser inducida por diversos estímulos, como daño en el ADN, estrés genotóxico, estrés oxidativo, o activación de oncogenes (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). La senescencia inducida por señales no teloméricas se ha denominado senescencia acelerada, senescencia prematura, o STASIS (*Stress or Aberrant Signalling Induced Senescence*).

Senescencia inducida por estrés oncogénico

Los oncogenes son versiones mutadas de genes reguladores de la homeostasis celular que, cuando se suman a mutaciones adicionales (como mutaciones en genes supresores de tumores), tienen el potencial de transformar las células. Las células primarias responden a la activación de muchos oncogenes entrando en una forma de senescencia denominada senescencia inducida por oncogenes, u OIS (*Oncogene Induced Senescence*).

Este fenómeno se describió por primera vez en fibroblastos primarios que expresaban una versión oncogénica de Ras. Este oncogén produce una primera ola de hiperproliferación seguida de una parada estable de ciclo, que se acompaña de la acumulación de p53 y p16 (Serrano et al., 1997). Posteriormente, se ha visto que otros efectores de la vía de Ras (como Raf, Mek), otros oncogenes como *Stat5* y *Mos*, y proteínas reguladoras de ciclo celular (como E2F1, cdc6, ciclina E), desencadenan una respuesta de senescencia celular cuando se sobreexpresan o se expresa su forma oncogénica (revisado en Courtois-Cox et al., 2008; Prieur and Peeper, 2008).

La intensidad de la señal oncogénica juega un importante papel en el desencadenamiento de senescencia. Así, se ha visto que, al menos en algunos tipos celulares, se induce senescencia en respuesta a altos niveles de señal oncogénica, pero no a bajos niveles (Woods et al., 1997; Sarkisian et al., 2007).

La importancia fisiológica de este proceso y su posible relevancia en supresión tumoral a nivel de organismo se ha sometido a debate durante mucho tiempo. Sin embargo, en los últimos años numerosos trabajos han demostrado que este proceso ocurre *in vivo* en tumores humanos y de ratón (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Courtois-Cox et al., 2006; Dankort et al., 2007; Sarkisian et al., 2007 y revisado en Courtois-Cox et al., 2008).

Estos autores muestran que mutaciones en K-Ras, B-Raf, PTEN o NF1 desencadenan senescencia celular *in vivo*. Además, los marcadores de senescencia se detectan en lesiones benignas y no en tumores avanzados. Estos datos llevan a un modelo donde los oncogenes producen una primera ráfaga de proliferación seguida de la entrada en senescencia, que suprime el desarrollo tumoral impidiendo la progresión de lesiones benignas. Además, recientemente se ha demostrado que la entrada en senescencia se asocia también a regresión tumoral, en modelos de reactivación de p53 (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Estos estudios demuestran el importante papel de la senescencia como barrera antitumoral *in vivo*.

Senescencia inducida por daño en el ADN

Está bien caracterizado que el daño en el ADN induce senescencia en varios tipos celulares. Una primera observación fue la inducción de una parada de ciclo permanente e irreversible en fibroblastos humanos irradiados (Di Leonardo et al., 1994). Estudios posteriores en células cultivadas *in vitro* mostraron que varias formas de daño en ADN, como estrés oxidativo, o inhibidores de las topoisomerasas inducían senescencia (te Poele et al., 2002; Parrinello et al., 2003).

Muchas drogas quimioterapéuticas producen daño en el ADN, e inducen senescencia en células normales. Resulta interesante que estas drogas también son capaces de inducir senescencia en determinadas células tumorales, lo que se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* (revisado en Roninson, 2003).

La senescencia inducida por daño en el ADN es claramente dependiente de la vía de p53, y generalmente se acompaña de una inducción de p21. Sin embargo, p16 también se induce, aunque con distinta cinética (revisado en Ben-Porath and Weinberg, 2005).

Datos recientes sugieren que el daño en el ADN puede ser un desencadenante común a diferentes formas de senescencia celular, incluyendo no solo la inducida por erosión telomérica, sino también la senescencia inducida por estrés oncogénico, (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). En apoyo de esta visión, se ha descrito la presencia de marcadores de daño en ADN en lesiones premalignas humanas (Gorgoulis et al., 2005), y existen estudios donde la inactivación de ATM parece suficiente para la evasión de senescencia en ciertos tipos celulares y tumores (Bartkova et al., 2006).

Actualmente existen dos modelos que proponen que la senescencia inducida por estrés oncogénico se debe a una acumulación de daño en el ADN. Un modelo propone que el estrés oncogénico produce un aumento en los niveles de ROS (*Reactive Oxygen Species*, especies reactivas de oxígeno) celulares, que son los que producen daño en el ADN. Se sabe que los ROS son potentes agentes genotóxicos (Lee et al., 1999), y por otro lado agentes causantes de ROS son también capaces de inducir senescencia (Chen et al., 1998; Fripiat et al., 2000). Un segundo modelo sugiere que el daño en el ADN es producido por la excesiva proliferación y replicación aberrante que sufren las células en una primera etapa tras la señal oncogénica, que tiene como resultado la activación de las quinasas ATR y ATM (Di Micco et al., 2006).

Sin embargo, la importancia de la respuesta DDR en supresión tumoral *in vivo* se ha cuestionado. Por una parte, no todos los oncogenes inducen daño en el ADN (Hemann and Narita, 2007). Además, existen estudios en modelos de ratón que demuestran que es la vía de ARF-p53 la responsable de suprimir el desarrollo tumoral en respuesta a activación de oncogenes y no la respuesta a daño en el ADN (Efeyan et al., 2006; Christophorou et al., 2006). En conjunto, estos datos sugieren que quizá múltiples vías pueden estar cooperando en esta respuesta.

1.3. Senescencia y cromatina

La entrada en senescencia se acompaña de cambios en la estructura de la cromatina, asociados a cambios en la expresión génica. El estado de la cromatina determina la medida

en la cual los genes están activos o reprimidos. Así, dentro de la cromatina podemos distinguir dos tipos: La eucromatina, que se encuentra descondensada durante la interfase celular, y comprende la mayoría de los genes activos en transcripción, y la heterocromatina, que se encuentra condensada durante la interfase y por tanto es transcripcionalmente inactiva. Los extremos N-terminales de las histonas están sometidos a distintas modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación. Según la teoría del código de histonas, la capacidad de determinadas proteínas de asociarse específicamente con ciertas modificaciones de histonas determina la naturaleza de los complejos proteicos que se unen a la cromatina. Estos complejos tienen la función de activar o reprimir transcripción, o ayudar a mantener una estructura de cromatina determinada (Jenuwein and Allis, 2001).

Las modificaciones de histonas mejor estudiadas son la acetilación y la metilación. La acetilación de histonas se asocia generalmente a regiones activas en transcripción. Muchos coactivadores transcripcionales contienen actividad histona acetil-transferasa (HAT), incluyendo CBP/p300 (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996b), la familia p160 (Spencer et al., 1997) y P/CAF (Yang et al., 1996). De igual forma, las histona desacetilasas están ligadas a represión transcripcional, formando parte de complejos represores como es el caso de HDAC1 y 2, que se asocian típicamente con los complejos Sin3a-SAP, NuRD y CoRest (Minucci and Pelicci, 2006; Mariadason, 2008). Mientras que la metilación de argininas en la histona 3 e histona 4 se asocia a activación transcripcional, la metilación de lisinas puede tener efectos de activación o represión, dependiendo de los sitios de metilación. Así, la metilación en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9) y en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) se asocia a represión, sin embargo la metilación en H3K4, -K36 y -K79 se asocia a procesos de activación transcripcional. Es más, las arginina metiltransferasas como PRMT1 son activadores transcripcionales, mientras que las H3K9 metiltransferasas como SUV39H1 y G9a son represoras (revisado en Zhang and Reinberg, 2001; Berger, 2007)

La acetilación de histonas es un proceso reversible, por tanto las HDAC y HATs actúan como interruptores que hacen que una determinada región de cromatina sea activa o inactiva en transcripción. Sin embargo, otras modificaciones pueden hacer más estable el estado de la cromatina, constituyendo una marca epigenética más estable. Así, la lisina 9 de la histona 3 hipoacetilada, frecuentemente se metila formando H3K9Me3. Esta modificación proporciona un sitio de unión para las proteínas de heterocromatina-1 (HP1) α , β , γ (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). La unión de estas proteínas contribuye a aumentar el grado de compactación de la cromatina y una inactivación de la transcripción estable (Nielsen et al., 2001).

Hay múltiples evidencias que apoyan que la senescencia es un proceso regulado epigenéticamente, relacionando los cambios de expresión génica durante senescencia con la maquinaria de remodelación de cromatina. Por un lado, inhibidores químicos de histona deacetilasas son capaces de inducir senescencia, presumiblemente mediante activación de la transcripción (Ogryzko et al., 1996a; Munro et al., 2004); por otro lado se ha demostrado el importante papel en el control de senescencia de proteínas implicadas en remodelación de cromatina, como Bmi-1 (Jacobs et al., 1999), CBX-7 (Gil et al., 2004), SNF5 (Oruetebarria et al., 2004) o HDAC4 (Berns et al., 2004).

Además, se ha descrito la aparición de nuevas estructuras de heterocromatina en fibroblastos humanos senescentes. Estas estructuras, bautizadas como SAHFs (*Senescence-Associated Heterochromatin Foci*) definen sitios inactivos en transcripción, en un proceso que implica a Rb y a factores de la familia de E2F (Narita, 2007; Zhang and Adams, 2007). Estos SAHFs se acumulan durante la senescencia replicativa o inducida por estrés oncogénico, y podrían contribuir a la irreversibilidad del fenotipo senescente, suprimiendo establemente la expresión de genes diana de E2F a través del reclutamiento de Rb y proteínas de heterocromatina (Narita et al., 2003). Estos focos contienen numerosas proteínas características de heterocromatina, incluyendo histonas hipoacetiladas, histona 3 metilada en lisina 9 (H3K9Me3) y HP1. Los SAHFs también se caracterizan por la desaparición de la Histona H1 y el enriquecimiento de otras proteínas como la variante de histona macroH2A y las proteínas HMGA (Zhang et al., 2005; Funayama et al., 2006; Narita et al., 2006 y revisado en Funayama and Ishikawa, 2007).

1.4. p53 y Rb

Aunque diversos estímulos son capaces de inducir senescencia, todos parecen converger en dos vías que establecen y mantienen el cese de proliferación asociado a esta respuesta. Estas vías están gobernadas por los supresores tumorales p53 y Rb. Durante la entrada en senescencia, p53 se activa e induce la expresión de sus dianas transcripcionales como p21. Rb se encuentra en su estado hipofosforilado, unido a los factores E2F e impidiendo la transcripción de sus genes diana, que son efectores de ciclo celular (Narita et al., 2003). Así, las vías de p53 y Rb juegan un papel crítico integrando y procesando señales de estrés en el contexto de senescencia.

Distintos estudios han intentado establecer la importancia relativa de cada vía en la respuesta de senescencia. El resultado de estos estudios es complejo, y pone de manifiesto la existencia de diferencias según el tipo celular y la especie.

En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*), la vía de p53 es esencial para la adquisición y el mantenimiento del fenotipo senescente. En el caso de Rb, la pérdida de función no afecta a la entrada en senescencia, para lo que necesita la inactivación adicional de los miembros de su familia p107 y p130. Sin embargo, sí parece importante para el mantenimiento del fenotipo senescente (Dirac and Bernards, 2003; Sage et al., 2003). p21, gen diana de p53 e inhibidor de los complejos CDK2/Ciclina E, se ha considerado el principal candidato para la parada de ciclo asociada a senescencia. No obstante, los MEFs procedentes de ratones genéticamente nulos para p21 no tienen afectada esta respuesta (Pantoja and Serrano, 1999).

Numerosos estudios apoyan que en células humanas se necesita inactivar las dos vías para evadir la senescencia, ya que la eliminación de cada una por separado consigue, a lo sumo, retardar la entrada en senescencia en algunos tipos celulares. Según esto, p53 y Rb

actúan en vías paralelas y desarrollan papeles parcialmente redundantes, lo que proporciona a las células un nivel mayor de protección.

A pesar de que ésta es la visión general, existen estudios que apoyan que la falta de actividad de p53 o Rb es suficiente para evitar la entrada en senescencia (Wei et al., 2003; Voorhoeve and Agami, 2003). Opuesto a lo que ocurre en ratón, la inactivación de p21 por recombinación homóloga es suficiente para evadir la entrada en senescencia (Brown et al., 1997). Por otro lado, la inactivación de p53 en ciertas líneas de fibroblastos humanos que han desencadenado senescencia

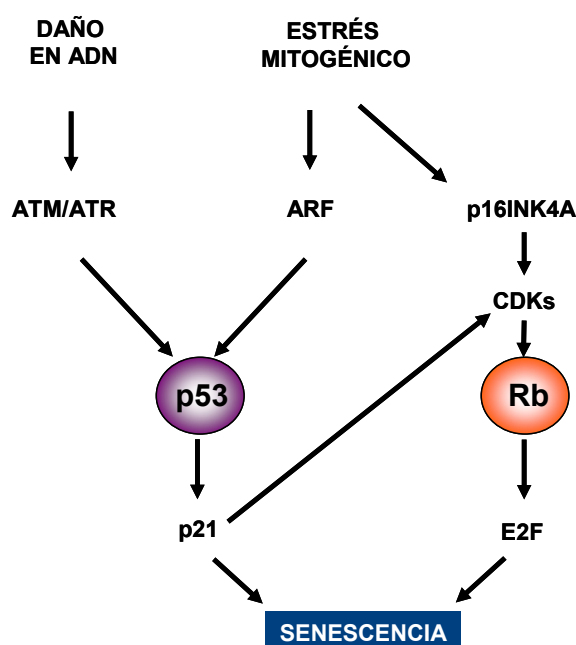


Figura 3. Vías de señalización implicadas en la inducción de senescencia celular

replicativa permite que las células entren de nuevo en ciclo. Parece que son los niveles de p16 los que determinan si la inactivación de p53 revierte o no el fenotipo senescente (Beausejour et al., 2003).

Como se ha comentado anteriormente, la senescencia supone cambios en la organización de la cromatina, y la aparición de SAHFs, que silencian los genes necesarios para la proliferación. La vía de Rb es crucial para la formación de SAHFs y, por tanto, Rb parece especialmente importante para asegurar la irreversibilidad de la parada de ciclo. La participación de p53 en la formación de SAHFs está más discutida. La expresión de un

dominante negativo de p53 no impide la formación de SAHFs tras la expresión de Ras oncogénico. Sin embargo, p53 parece formar parte de una vía de formación de SAHFs que implica p400 de forma independiente de Rb, y la formación de SAHFs, al menos en ciertas condiciones, requiere la vía de p53 funcional (revisado en Funayama and Ishikawa, 2007). De acuerdo con esto, p53 y Rb podrían formar dos vías distintas que llevan a la formación de SAHFs.

1.4.1. Reguladores de p53 y Rb: El locus INK4A/ARF

El locus INK4A/ARF juega un importante papel en supresión tumoral. Este locus codifica, por un lado, para el supresor tumoral p16INK4a, inhibidor de las quinasas CDK4 y CDK6, que regulan la fosforilación de Rb en la fase G1 del ciclo celular. Próximo al locus, se encuentra p15INK4b, de funciones bioquímicas indistinguibles a las de p16. Por otro lado, el locus codifica para el supresor de tumores ARF (*Alternative Reading Frame*), conectado con p53. ARF comparte dos exones con p16, pero se traduce en una pauta de lectura distinta (Gil and Peters, 2006). Por tanto, los productos de este locus son reguladores de las vías de p53 y Rb y de la entrada en senescencia.

p16 es el principal regulador de Rb durante senescencia. La inactivación de p16 en células humanas causa un retardo en la entrada en senescencia en algunos tipos celulares. p16 es uno de los genes que se encuentra más frecuentemente mutado en tumores humanos. Sin embargo, su papel en tumorigénesis en ratón es controvertido (Krimpenfort et al., 2001; Sharpless et al., 2001; Sharpless et al., 2004). En MEFs, p16 se induce en senescencia, pero su inactivación no la evita (Zindy et al., 1997; Palmero et al., 1997; Sharpless et al., 2001 y revisado en Ben-Porath and Weinberg, 2005). De modo que parece que las vías de senescencia están conservadas entre humano y ratón, pero la importancia de la vía p16-Rb está aumentada en humanos.

En el contexto de senescencia, p53 se activa por dos vías principales: Una es a través de una respuesta de daño en ADN, mediada por las quinasas ATM/ATR y CHK1/CHK2, que activan a p53 por fosforilación. La otra vía es a través de ARF (p14ARF en células humanas, p19ARF en células de ratón). ARF estabiliza p53 secuestrando en el nucleolo a MDM2, una E3-ubiquitín ligasa que induce la degradación de p53 por el proteasoma. Aunque éste es el proceso mejor caracterizado de la acción de ARF sobre p53, hoy se sabe que también favorece la estabilización de p53 en nucleoplasma y mediante mecanismos independientes de MDM2.

ARF se activa en situaciones de estrés, como la activación de oncogenes, o la acumulación de pases en cultivo. Aunque no está involucrado en la activación de p53 tras

daño a ADN, se sabe que contribuye a su estabilización en estas circunstancias, (Khan et al., 2000; Khan et al., 2004).

ARF es un importante supresor tumoral en ratón. En fibroblastos embrionarios de ratón ARF se induce en respuesta a Ras oncogénico y la acumulación de divisiones en cultivo, y es un mediador esencial de la entrada en senescencia inducida por oncogenes. De acuerdo con esto, los MEFs p19ARF-nulos son insensibles a la inducción de senescencia por Ras-V12 (Palmero et al., 1998; Groth et al., 2000; Lin and Lowe, 2001), y los ratones deficientes en ARF desarrollan un amplio número de tumores (Kamijo et al., 1997). Sin embargo, en humanos su papel está peor establecido. ARF no se activa de igual forma durante inducción de senescencia por Ras V12 en células humanas, y está aceptado que la vía de ARF es más importante durante senescencia en células de ratón.

En resumen, el locus INK4a/ARF y sus productos son mediadores centrales de la respuesta de senescencia celular, en conexión con los supresores tumorales p53 y Rb. Existen diferencias en la importancia de las dos vías dependiendo de la especie. Así, mientras que en ratón la senescencia inducida por estrés oncogénico está mediada por la vía ARF-p53-Rb, en humanos la vía p16-Rb adquiere un papel más predominante.

2. La familia de proteínas ING.

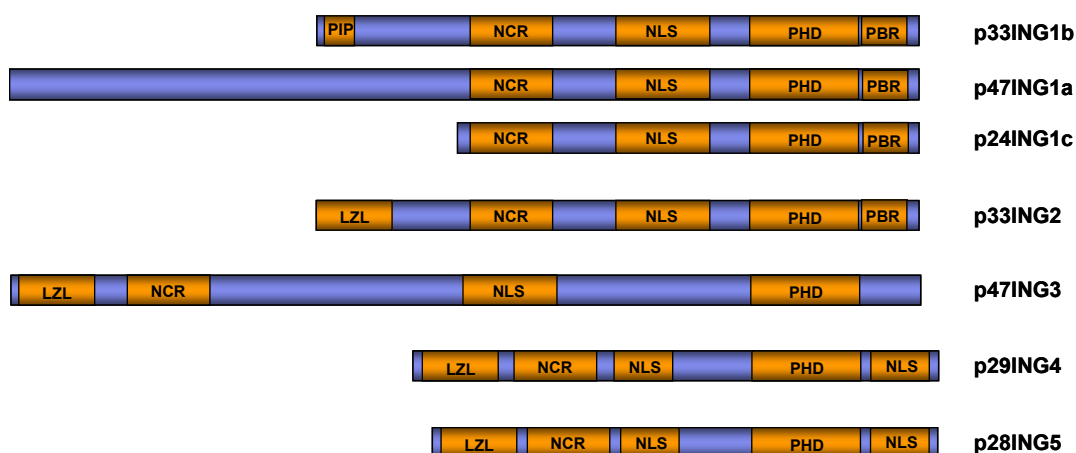


Figura 4. La familia de proteínas ING. PIP: Dominio de interacción con PCNA; NCR: Nueva región conservada; NLS: Secuencias de localización nuclear; PBR: Región polibásica; LZL: dominio de cremalleras de leucina.

La familia de proteínas ING (*Inhibitor of Growth*) constituye una familia conservada durante la evolución, con miembros presentes desde levaduras hasta humanos. En mamíferos, esta familia comprende varios miembros, productos del procesamiento de cinco loci relacionados (*ING1 a ING5*). *ING1*, miembro fundador de la familia, se descubrió en 1996

como consecuencia de un abordaje para encontrar genes con expresión disminuida en células de cáncer de mama (Garkavtsev et al., 1996). Desde entonces, y mediante la búsqueda de homología de secuencia, se han ido identificando el resto de miembros de esta familia de supresores tumorales.

Todos los miembros de la familia comparten una arquitectura similar, conteniendo un extremo N-terminal variable, una secuencia de localización nuclear en la zona central y una región C-terminal altamente conservada que contiene un dominio PHD (*Plant HomeoDomain*), involucrado en interacción proteína-proteína y procesos de remodelación de cromatina (revisado en Shi and Gozani, 2005; Soliman and Riabowol, 2007). Todos los loci *ING* humanos se encuentran en cromosomas diferentes, y curiosamente, se localizan en la región subtelomérica de los mismos, excepto *ING3*.

ING1, así como otros miembros de la familia, ha sido implicado en procesos relacionados con supresión tumoral como regulación negativa de la proliferación celular, inducción de apoptosis, senescencia celular, reparación de ADN, inhibición por contacto e inhibición de angiogénesis. Por otro lado, se sabe que esta familia de proteínas realiza sus funciones en conexión con la vía de p53 y procesos de remodelación de cromatina (revisado en Shi and Gozani, 2005).

2.1. ING1b

2.1.1. Estructura y localización

El locus ING1 humano contiene cuatro exones, a través de los cuales da lugar a tres proteínas. Los diferentes péptidos se obtienen a partir de transcritos originados por la unión del exón 1c, el exón 1b o el exón 1a con el exón común 2, dando lugar, respectivamente, a las proteínas p24ING1c, p33ING1b y p47ING1a. El exón 1c no posee una región codificante, por tanto p24ING1c se genera a partir de un codón de inicio de traducción interno en el exón 2 (basado en los datos depositados en www.ensembl.org, y revisado en Ythier et al., 2008).

El locus de ratón comprende también tres primeros exones alternativos, 1a, 1b, 1c y un exón 2 común. Sin embargo, el exón 1a, al igual que el exón 1c, no posee ADN codificante, y no existen evidencias de la existencia de una proteína homóloga a p47ING1a en ratón. Así, el procesamiento entre los exones 1b y 2 y su posterior traducción da lugar a la proteína p33ING1b, mientras que el procesamiento entre los exones 1a y 2, y 1c y 2, y su posterior traducción da lugar a la proteína p24ING1c (Zeremski et al., 1999).

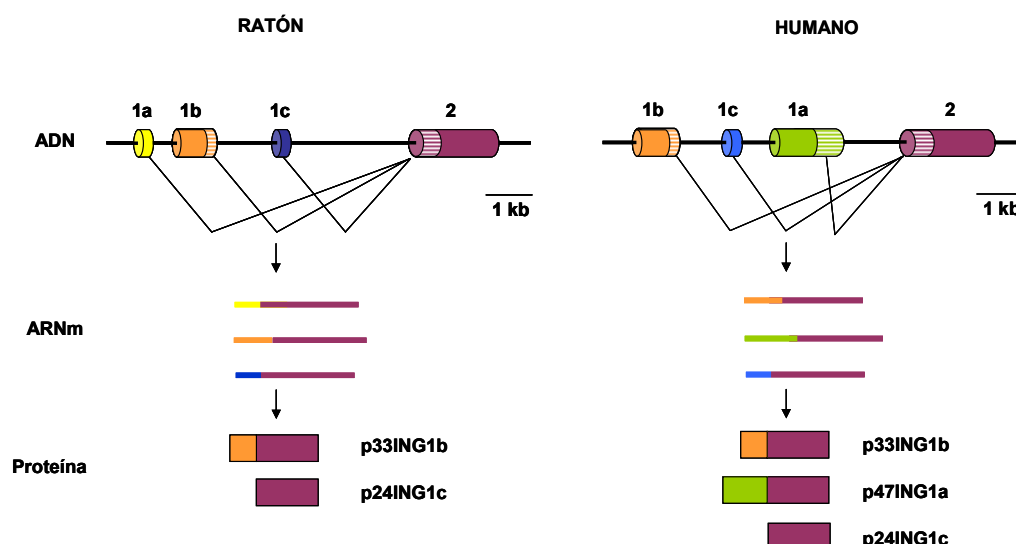


Figura 5. Estructura del locus ING1 humano y de ratón.

La proteína p33ING1b (también denominada ING1b, o p33ING1) tiene 279 aminoácidos, y un peso molecular de 33 kDa. En condiciones normales, esta proteína tiene una localización nuclear, (revisado en Ythier et al., 2008).

ING1b tiene un alto grado de homología entre ratón y humano, y ambas proteínas comparten una misma estructura. El extremo N-terminal de ING1b media la mayoría de las interacciones proteína-proteína conocidas. En esta región se encuentra el dominio PIP (*PCNA Interacting Domain*), a través del cual interacciona directamente con PCNA tras daño en el ADN producido por UV (Scott et al., 2001b). Dentro del N-terminal, y mediante análisis bioinformático se ha identificado el dominio NCR (*Novel Conserved Region*), conservado entre los distintos miembros de la familia ING. Aunque se ha especulado que puede intervenir en la unión de HATs y HDACs (Kuzmichev et al., 2002 y revisado en Soliman and Riabowol, 2007), recientemente se ha descrito que media la interacción con Lamina A (Han et al., 2008). Otra región muy conservada es la señal de localización nuclear, localizada en la zona central. Esta región contiene a su vez dos señales de localización nucleolar, responsables del reclutamiento de ING1b en el nucleolo en respuesta a diferentes tipos de estrés (Scott et al., 2001a).

En el extremo C-terminal de la proteína se encuentra el dominio más conservado de la familia, el dominio PHD (*Plant Homeodomain*). Este dominio contiene un motivo de dedos de Zinc tipo C4HC3, se relaciona con interacciones proteína-proteína y se encuentra generalmente en proteínas relacionadas con remodelación de cromatina (Baker et al., 2008). De hecho, recientemente se ha descrito que distintos miembros de la familia, incluyendo ING1b se unen a la histona H3 mediante el dominio PHD (ver más adelante).

En ING1 e ING2, junto a este dominio se encuentra una región rica en aminoácidos básicos llamada PBR (*Polibasic Region*), que se ha implicado en la unión de fosfoinosítidos fosfato (PIPs), moléculas de señalización lipídica. La unión de los fosfoinosítidos a esta región parece ser relevante para la unión de ING2 a la cromatina, y necesaria para la activación de p53 en respuesta a daño en el ADN (Gozani et al., 2003). Dada la gran homología de esta zona entre ING1 e ING2, un mecanismo similar podría ser aplicable a ING1.

2.1.2. Funciones biológicas de ING1b

Desde su descubrimiento, son numerosas las evidencias que han relacionado a ING1b y otros miembros de la familia ING con supresión tumoral. Se han descrito numerosas alteraciones del locus *ING1* y otros loci *ING* asociadas a un amplio espectro de tumores, incluyendo cáncer de mama, ovario, estómago, pulmón, cerebro y linfomas (revisado en Nouman et al., 2003b; Ythier et al., 2008). Aunque la alteración más frecuente es la disminución o pérdida de la expresión, también se ha descrito pérdida de localización nuclear, metilación del promotor y, aunque de manera infrecuente, delección y mutaciones puntuales, situándose la mayoría de ellas en el dominio PHD y en la región NLS. Por otro lado, el locus *ING1* humano se encuentra en el cromosoma 13, en la región q33-34, una región con frecuente pérdida de heterocigosidad.

Además, ING1b y otros miembros de la familia, parecen realizar sus funciones en procesos relacionados con supresión tumoral, como parada del ciclo celular, inducción de apoptosis, reparación de ADN, inhibición por contacto e inhibición de angiogénesis (revisado en Shi and Gozani, 2005). Por último, recientemente se ha descrito que ratones deficientes para el locus *Ing1* desarrollan una predisposición a la aparición de linfomas, apoyando su papel como supresor tumoral *in vivo* (Kichina et al., 2006; Coles et al., 2007).

Existen varios estudios en líneas celulares que proponen que ING1b está relacionado con respuesta a estrés genotóxico. Por un lado, se ha propuesto que ING1b está implicado en la parada del ciclo y apoptosis en respuesta a daño en ADN (Garkavtsev et al., 1998; Kataoka et al., 2003). La exposición a UV en fibroblastos humanos favorece la asociación de ING1b con PCNA, que es necesaria para la inducción de apoptosis (Scott et al., 2001a; Scott et al., 2001b) y disocia el complejo p300-PCNA, implicado en reparación de ADN y remodelación de cromatina (Vieyra et al., 2002). Por otra parte, ING1b también podría participar en reparación de ADN mediante la interacción con GADD45 o facilitando el acceso a la cromatina de proteínas implicadas en reparación como XPA (Cheung et al., 2001; Kuo et al., 2007).

Aunque estos datos sugieren que ING1b puede actuar como nexo entre reparación de ADN, apoptosis, y remodelación de cromatina, recientes estudios en modelos animales no apoyan esta teoría *in vivo*. Los timocitos procedentes de ratones deficientes para *Ing1* sufren apoptosis en respuesta a estrés genotóxico, inducido por radiación γ y otros agentes (Coles et al., 2007; Abad et al., 2007). Además, los MEFs nulos para *Ing1* muestran la misma sensibilidad a drogas quimioterapéuticas que los de fenotipo silvestre (MEFs wt), y unas diferencias marginales en respuesta a UV (Kichina et al., 2006 y datos propios no publicados). En conjunto, estos datos apuntan a que la conexión de ING1 con estrés genotóxico es compleja, y puede depender del tipo celular y/o la naturaleza del daño.

Existen muchas evidencias de que ING1b y p53 están conectados funcionalmente. En este contexto, se ha descrito que ambas proteínas interaccionan físicamente (Garkavtsev et al., 1998). ING1b promueve la estabilización y acumulación de p53 compitiendo con MDM2 por la unión de p53, evitando de esta forma su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (Leung et al., 2002). Además, se ha propuesto que ING1b promueve la acetilación de p53 en su extremo C-terminal, inhibiendo la deacetilasa Sir2, o mediante la interacción con las histona acetil transferasas p300/CBP o PCAF (Feng et al., 2002; Kataoka et al., 2003). La relevancia de este proceso *in vivo* no está clara, ya que en MEFs deficientes en *Ing1* la acetilación de p53 en respuesta a daño en el ADN es normal (Abad et al., 2007).

Se ha propuesto también que ING1b podría actuar como cofactor transcripcional de p53, a través del reclutamiento de complejos con actividad HAT/HDAC (Garkavtsev et al., 1998 y revisado en Shi and Gozani, 2005).

Numerosos estudios apoyan que ING1b para realizar sus funciones biológicas requiere p53 funcional. Así, se sabe que ING1b puede sensibilizar a apoptosis o inducir parada de ciclo de forma dependiente de p53 (Garkavtsev et al., 1998; Shinoura et al., 1999; Cheung and Li, 2002; Gonzalez et al., 2006; Zhu et al., 2006). Sin embargo, también hay evidencias de que ING1b puede ejercer funciones de forma p53 independiente (Tsang et al., 2003) y se ha descrito que la ausencia de ING1b en MEFs provoca un aumento en la proliferación independiente de p53 (Coles et al., 2007).

2.1.3. ING1b y cromatina

Numerosas evidencias indican la participación de las proteínas ING en regulación de cromatina. Los primeros datos se obtuvieron en levaduras, donde se identificó que los ortólogos de las proteínas ING Yng1, Yng2 y Pho23 se asociaban a complejos con actividad histona acetil transferasa (Loewith et al., 2000).

Posteriormente, se ha demostrado en células de mamífero que ING1b y otras proteínas ING forman parte de complejos multiprotéicos con actividad histona acetil transferasa (HAT), histona desacetilasa (HDAC), y ADN metil transferasa, responsables de activación o represión transcripcional. Así, para ING1b se ha descrito asociación tanto con las acetilasas CBP, p300, TRRAP y PCAF, como con las desacetilasas Sir2 y HDAC1 (Skowrya et al., 2001; Kuzmichev et al., 2002; Vieyra et al., 2002; Doyon et al., 2004; Doyon et al., 2006). Aunque ING1b se asocia a los dos tipos de complejos modificadores de histonas, parece que la conexión con represión transcripcional tiene más relevancia funcional (Kuzmichev et al., 2002; Goeman et al., 2005). En este contexto, se ha descrito que ING1b tiene un papel en la formación de nueva heterocromatina pericéntrica, en un proceso en el que interacciona con el complejo ADN metil transferasa DNMT1 a través de la asociación con la proteína DMAP, y con el complejo Sin3a/HDAC (Xin et al., 2004).

Recientemente se ha propuesto un mecanismo por el cual las proteínas ING conectan las actividades modificadoras de histonas a regulación transcripcional. Varias proteínas ING se unen específicamente a la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4Me3), marcador de promotores activos, a través del dominio PHD (Shi et al., 2006; Pena et al., 2006; Palacios et al., 2008; Pena et al., 2008). En concreto, se ha descrito que ING2 se une a H3K4Me3, reclutando complejos con actividad HDAC y reprimiendo genes implicados en proliferación (Pena et al., 2006). En levaduras, Yng1 interacciona con la H3K4me3 y recluta el complejo acetilasa NuA3, acetilando la histona H3K14 y afectando la transcripción de determinados genes (Taverna et al., 2006).

El modelo actual propone que la regulación transcripcional por parte de las proteínas ING implicaría varios niveles de regulación. Estas proteínas forman complejos que contienen HAT/HDAC y factores de transcripción (por ejemplo p53); estos complejos se unen a cromatina por el efecto combinado del reconocimiento de marcas de histona y la unión a secuencias reguladoras específicas. Este anclaje promueve cambios en la expresión génica, y puede a su vez resultar en la propagación de cambios secundarios en los nucleosomas cercanos para el establecimiento de un estado epigenético específico (revisado en Shi and Gozani, 2005 y Soliman and Riabowol, 2007).

El mecanismo por el cual ING1b se asocia a regiones de cromatina determinadas es por el momento desconocido. Sin embargo, existen evidencias de que varios dominios de la proteína pueden estar implicados. Por un lado, se ha propuesto que señales de estrés provocan aumentos en los niveles locales de PIPs, que se unen a ING1b a través de su dominio PBR, próximo al PHD, y dirigen la localización de ING y sus complejos asociados a una región subnuclear específica (Gozani et al., 2003). Por otro lado, recientemente se ha propuesto que ING1b interacciona con la Lamina A, componente de la envuelta nuclear, a

través de un dominio conservado en el extremo N-terminal. Esta unión parece mantener la localización nuclear de ING1b, y es necesaria para la inducción de apoptosis por parte de ING1b (Han et al., 2008). Por tanto, varios dominios de la proteína podrían estar implicados en la localización de ING1b en una zona nuclear determinada, y por tanto en el reconocimiento de regiones génicas específicas.

2.1.4. Regulación de ING1b

Actualmente existen pocos datos sobre la regulación de ING1b. Se ha descrito que varias proteínas ING se acumulan en respuesta a luz UV en algunos tipos celulares (Cheung et al., 2000; Scott et al., 2001a; Scott et al., 2001b), y otros estímulos causantes de daño en el ADN (Nagashima et al., 2001), aunque esta respuesta no es universal (datos propios no publicados). Recientemente, se ha descrito que ING1b se regula por fosforilación. Por un lado, ING1b fosforilado en la Serina 199 es capaz de unirse a la proteína 14-3-3, y esta unión promueve su traslocación al citoplasma (Gong et al., 2006). Por otro, se ha descrito que ING1b se fosforila en la Serina 126. Esta fosforilación se induce tras daño en el ADN, cambiando la afinidad de la proteína con la maquinaria de degradación del proteasoma, lo que promueve su estabilización y regula la proliferación de células de melanoma (Garate et al., 2007; Garate et al., 2008).

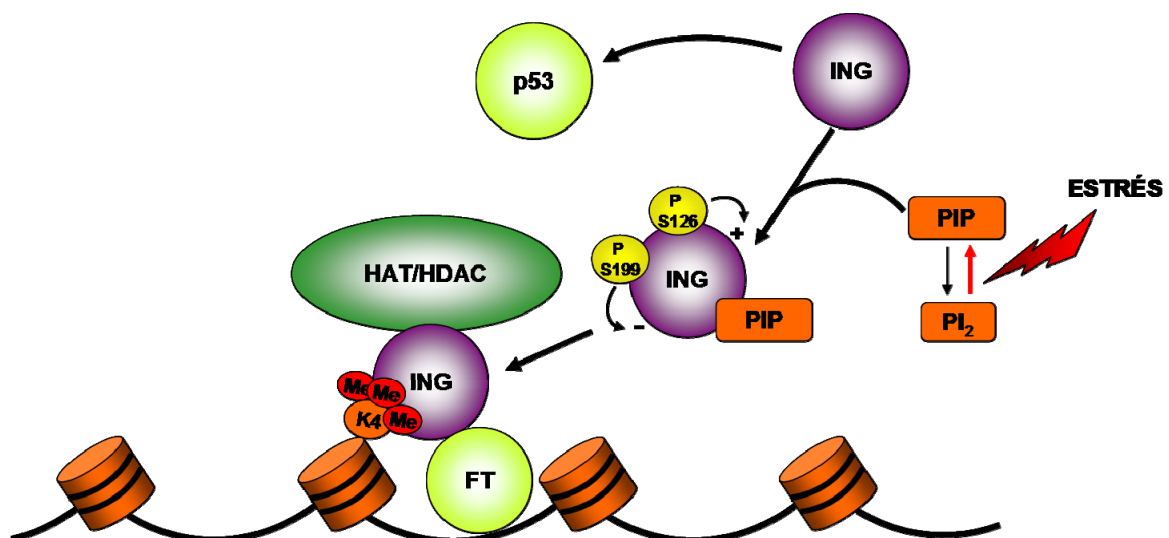
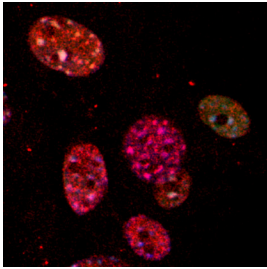


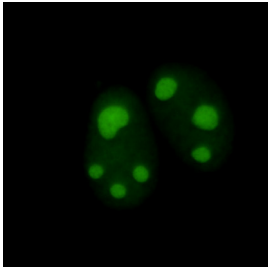
Figura 6. Modelo de acción de ING1b.

Con estos antecedentes, nos pareció interesante estudiar el posible papel de la proteína ING1b en la implementación de senescencia celular. Para ello, hemos utilizado modelos celulares de ganancia y pérdida de función. En un primer modelo, de ganancia de función, analizamos el efecto de la expresión ectópica de ING1b en fibroblastos embrionarios humanos. En estas mismas células, hemos analizado el efecto de la falta de ING1b en senescencia inducida por oncogenes. Un segundo modelo de pérdida de función se basa en fibroblastos embrionarios de ratón procedentes de ratones transgénicos en los cuales el locus *Ing1* ha sido inactivado por la inserción de un casete *gene-trap*. Estas herramientas nos han servido para demostrar la importancia de ING1b como regulador de senescencia celular, en conexión con la vía de p53 y con procesos de remodelación de cromatina.



Objetivos

1. Caracterizar el efecto de la sobreexpresión de ING1b en fibroblastos primarios humanos.
2. Analizar la participación de ING1b endógeno durante senescencia inducida por estrés oncogénico en fibroblastos primarios humanos.
3. Examinar el impacto de la pérdida de Ing1b en el contexto de senescencia celular en células de ratón, usando un modelo animal de deficiencia en *Ing1*.
4. Analizar la relevancia de la conexión de ING1b con regulación de expresión génica y modificación de cromatina en la inducción de senescencia celular.



Materiales y Métodos

1. Generación de ratones *gene-trap* para el locus *Ing1*

Los ratones fueron generados en el laboratorio de Ernst-Martin Füchtbauer, Universidad de Aarhus, Dinamarca. Dentro de un abordaje a nivel global de inactivación génica en ratón, células troncales embrionarias (ES) de ratón (TBV-2) fueron electroporadas con el vector pT1ATG β Geo. Este vector contiene un casete β -Geo compuesto por un sitio aceptor de procesamiento seguido de la fusión de un gen reportero sin promotor (β -galactosidasa) y un marcador de selección (resistencia a Neomicina). Para identificar el locus de inserción se utilizó RACE y secuenciación. Un clon de células ES con la inserción de una copia del casete en el locus *Ing1*, se utilizó para la generación de quimeras, mediante microinyección en blastocistos. Las quimeras con transmisión por vía germinal se cruzaron para obtener ratones con alelos *Ing1* modificados.

2. Cultivos celulares

Los fibroblastos primarios embrionarios de ratón (MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*) de genotipo silvestre y deficientes en *Ing1* fueron obtenidos a partir de embriones de fondo genético 129Sv/Pas, de día 13,5 de desarrollo, siguiendo el protocolo descrito previamente (Palmero and Serrano, 2001). Para este trabajo, se han utilizado fibroblastos de embriones procedentes de al menos diez camadas distintas. Los MEFs procedentes de ratones p53 nulos (Jacks et al., 1994) fueron cedidos por Manuel Serrano, CNIO, Madrid. También hemos utilizado la línea IMR90 de fibroblastos primarios embrionarios de pulmón humanos, procedente de la ATCC. Como células empaquetadoras de retrovirus usamos la línea 293T, de células epiteliales de riñón humano, que expresan el antígeno T del virus SV40.

Las células descritas fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Fetal Calf Serum, Gibco) inactivado por calor, y antibióticos (50 U/ml de penicilina, 0,05 mg/ml de estreptomicina). Como excepciones, en el caso de las IMR90 infectadas con la oncoproteína E6, el medio fue suplementado con 20% de suero fetal bovino, y las IMR90 que expresaban MEK1 de forma inducible (MEK1:ER) se cultivaron en medio DMEM sin rojo fenol (Gibco).

Los cultivos se mantuvieron en incubadores con una atmósfera de 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

3. Infección retroviral

En todos los casos, se utilizaron MEFs y células IMR90 de pase temprano, correspondiente a 4 PDLs (*Population Doubling Level*) en MEFs, y a un número de PDLs menor de 30 en el caso de las IMR90. Para poder infectar las IMR90 con virus ecotrópicos, estas fueron infectadas previamente con un vector retroviral pWZL-Neo-EcoR, que expresa el receptor ecotrópico.

Las células seleccionadas para la expresión de este vector se utilizaron para las infecciones retrovirales en fibroblastos humanos descritas en este trabajo, excepto las realizadas con el vector de expresión de E6, y con el vector de expresión inducible de MEK1, que se hicieron directamente sobre las IMR90, ya que estos vectores poseen resistencia a Neomicina.

El protocolo de infección que seguimos es el que se ha descrito previamente (Palmero and Serrano, 2001), con pequeñas modificaciones. De forma breve, para la producción de virus las células 293T fueron cotransfectadas de forma transitoria mediante la técnica de fosfato cálcico, con 10 µg del vector retroviral de interés y 10 µg del vector pCLEco o pCLAmpho que expresa los genes virales gag, pol y env^{Eco} o env^{Ampho}. Pasadas 48 horas, el sobrenadante que contenía las partículas virales se filtró con un filtro de 0,45 µm, se diluyó 1 en 2 con medio fresco y se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml. Este sobrenadante se añadió a los cultivos a infectar (MEFs o IMR90), plaqueadas el día anterior a una densidad de 8×10^5 células por placa de 10 cm. Este procedimiento se repitió a las 12 horas, con una concentración de polibreno de 4 µg/ml y a las 24 horas con 8 µg/ml. Tras un día de recuperación con medio fresco, las células se sometieron a selección con antibiótico (Puomicina a 2 µg/ml, G418 a 400 µg/ml), durante un periodo de 3 a 6 días.

4. Ensayos de formación de colonias

Los MEFs infectados con las construcciones indicadas se plaquearon un día después del final de la selección, a una densidad de 2000 células por placa petri de 10 cm, por triplicado. Las células se dejaron crecer en condiciones normales de cultivo, durante tres semanas, tras las cuales se fijaron con formaldehído y se tiñeron con Giemsa (SIGMA) para la visualización de colonias.

5. Curvas de crecimiento

Las diferentes células infectadas con las construcciones indicadas se plaquearon a día 1 postselección, a una densidad de 20.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, por duplicado. En los tiempos indicados las células se recogieron por tripsinización, y se contaron con una cámara de Neubauer.

En el caso de las células IMR90 inducibles para MEK1, después de la infección y posterior selección con los interferentes se trataron con 1µM de 4-OHT, (4-hydroxitamoxifeno, SIGMA), o con un volumen equivalente de etanol, como control de disolvente del 4-OHT. Las células se contaron el día del comienzo del tratamiento, y los días postinducción indicados.

6. Protocolo de pases seriados 3T3

Los MEFs de los genotipos indicados se plaquearon a una densidad de 175.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Cada tres días, las células eran tripsinizadas, contadas, y

plaqueadas de nuevo a la densidad inicial. El número de divisiones de la población se calculó usando la fórmula $PDL=3,32(\log N_f - \log N_i)$, donde N_i es el número de células sembradas y N_f es el número de células recuperadas tres días después para cada punto.

7. Ensayo de actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia

Los MEFs o células IMR90 infectadas y seleccionadas se plaquearon en placas de 6 pocillos, a una densidad de 40.000 células/pocillo. Al día siguiente se fijaron y tiñeron para SA- β -Gal como se ha descrito previamente (Dimri et al., 1995). Para hallar el porcentaje de células SA- β -Gal positivas, se contaron al menos 200 células de cada condición.

8. Determinación de la tasa de síntesis de ADN

El ensayo de incorporación de Timidina tritiada se realizó como se describe en (Goeman et al., 2005). Para medir la incorporación de BrdU se plaquearon MEFs o células IMR90 en portaobjetos de cristal de LabTek (30.000 células por pocillo, en cámaras de 8 pocillos), y 24 horas más tarde se incubaron 6 horas con BrdU, a una concentración final de 10 μ M. Las células BrdU positivas se detectaron mediante inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo descrito para inmunofluorescencia, excepto que se incluyó un tratamiento con HCl 2M durante 5 minutos antes del bloqueo. Para la detección se utilizó el anticuerpo anti-BrdU BP40250 de Megabase Research Products (dilución 1:1000). Las muestras fueron teñidas a la vez con DAPI para visualizar el núcleo. Para determinar el porcentaje en células BrdU positivas, se contaron al menos 200 núcleos en cada caso.

9. Inmunofluorescencia

Las células IMR90 o MEFs se plaquearon en portaobjetos de cristal (30.000 células por pocillo, en cámaras de 8 pocillos, de LabTek), y al día siguiente se procesaron para inmunofluorescencia, como se describe en (Gonzalez et al., 2006), con ligeras modificaciones. Brevemente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos, se permeabilizaron con Tritón X100 al 0,1% en PBS durante 15 minutos y se incubaron en solución de bloqueo (2% de BSA en PBS) toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubó durante al menos 2 horas con los anticuerpos primarios correspondientes en la misma solución de bloqueo, a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS-Tritón 0,1% (3-4 lavados) y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos, en solución de bloqueo (Tabla 2). Tras 3-4 lavados, las muestras se montaron con Vectashield con DAPI (Laboratorios Vector), y se analizaron en un microscopio de fluorescencia ZEISS Axiophot o en un microscopio confocal Leica TCS SP2 DMIRE 2.

Para la cuantificación de las señales de HP1 y H3K9, se definieron regiones de interés que se ajustasen al tamaño de los núcleos, y se midió la intensidad de cada canal para cada región

de interés, usando el Leica Confocal Software. Para dicha cuantificación se usaron datos de al menos 200 células de cada genotipo, capturadas en 4 sesiones diferentes.

10. Inmunoblot o *Western Blot*

El análisis de proteínas se realizó mediante el método de *Western Blot* o Inmunoblot. La preparación de los lisados totales celulares se realizó como se ha descrito previamente (Palmero et al., 2002).

Estos lisados se cuantificaron mediante la técnica de Lowry (Lowry Protein Assay, Bio Rad). Posteriormente, 20-30 µg de los lisados totales se resolvieron en geles SDS-PAGE de acrilamida-bisacrilamida (40%, Bio Rad), en los que la fracción separadora estaba preparada al 12%. Tras la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con 0,2 µm de tamaño de poro (Bio Rad), mediante transferencia húmeda durante 1 hora a 200 mA. Estas membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS-Tween 0,2%, durante al menos una hora.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 2) diluïdos en leche al 5% en PBS-Tween 0,2%. Tras tres lavados con PBS-Tween 0,2% se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a actividad peroxidasa (Tabla 3).

Las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia tras tres lavados con PBS-Tween 0,2% e incubación con ECL (Amersham).

De forma excepcional, para la detección de ATM fosforilado los geles de acrilamida se prepararon con un porcentaje del 8%, y la transferencia a membrana se realizó durante 3 horas a 260 mA. En este caso, la solución de bloqueo y los lavados se realizaron con TBS-Tween 0,5%.

11. RT-PCR y PCR cuantitativa

Se preparó ARN total utilizando Tri Reagent (Sigma) a partir de MEFs de los distintos genotipos o IMR90 creciendo asincrónicamente en subconfluencia. Se utilizaron 2µg del ARN total para sintetizar ADNc usando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega). 1 µl de la reacción fue utilizado para llevar a cabo reacciones estándar de PCR, o PCR cuantitativa. Para la PCR cuantitativa se utilizó el aparato Corbett Research Rotor Gene, en el caso de las realizadas en los MEFs, y Applied Biosystems StepOnePlus™ para las PCR cuantitativas en IMR90, siguiendo las instrucciones de los fabricantes en ambos casos. Los oligos utilizados fueron, para las RT-PCR y PCR cuantitativas realizadas en MEFs:

*Ing1*exón1a directo: 5'-CCTTCTCGTCCAGATTGG-3'

*Ing1*exón1b directo: 5'-ATGTTGAGTCCTGCCAACGG-3'

*Ing1*exón1b reverso: 5'-CTTGGTATTTGGCGTTCGATCTCC-3'

*Ing1*exón1c directo: 5'-ATCGCTTGTCGCGTTTCC-3'

Ing1 exón2 reverso: 5'-CTACCTGTTGTAAGCCC-3'

β-Geo reverso: 5'-GATGTGCTGCAAGGCGATTA-3'

Ing2 directo: 5'-CAGCAGCAGCTGTACTCG-3'

Ing2 reverso: 5'-ATCACAGTCGTCATCCCG-3'

Actina directo: 5'-TTGTAACCAACTGGGACGACATGG-3'

Actina reverso: 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'

Para las RT-PCR de IMR90:

ING1 exón1b directo: 5'-GGCACGGATCCATGACCGACTTCTACCTAAAGAGATTGAGTCCTGCCAACGG-3'

ING1 exón1a directo 5'-GCCTTGGATTGGTTCTTCTCGC-3'

ING1 exón2 reverso: 5'-GGCTCACGATCTGGATCTTCTCG-3'

Actina directo: 5'-TTGTAACCAACTGGGACGACATGG-3'

Actina reverso: 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'

Y para las PCR cuantitativas en IMR90:

ING1 exón1b directo 5'- GGACTACCTGGACTCCAT-3'

ING1 exón1a directo 5'- TCGGAGACAGTTTCAGGC-3'

ING1 exón2 reverso 5'- CGACTGAAGCGCTCGTA-3'

GAPDH directo: 5'-CAGAAGACTGTGGATGG-3'

GAPDH reverso: 5'-GCTTCACCACCTTCTTG-3'

12. Ensayo de tumorigénesis en ratones

Para analizar el fenotipo en transformación de MEFs de los genotipos indicados tras la expresión de Ras oncogénico, se recogieron 400.000 células por tripsinización, se resuspendieron en un volumen final de 100 µl de PBS y se inyectaron de forma subcutánea en los costados de ratones nu/nu. Se observó la aparición de tumores durante un periodo de 40 días.

13. Vectores de expresión

Los vectores de expresión que hemos utilizado para la expresión ectópica de proteínas son todos retrovirales, y se representan en la Tabla1.

Construcción del vector para la interferencia de ARN de ING1b

Para el clonaje del vector retroviral para la interferencia de ING1b, utilizamos como esqueleto el vector LMP, basado en el microARN miR30, cedido por el laboratorio de Scott Lowe, CSHL, USA. Este vector, una vez en la célula, genera shARNs de 22 nucleótidos complementarios a la secuencia del gen diana. Siguiendo las instrucciones de Open Biosystems

(www.openbiosystems.com), diseñamos un oligonucleótido que contenía 22 nucleótidos de la secuencia complementaria a ING1b, seguidos de un loop de miR30 y de la secuencia de ING1b en antisentido. Este oligo se utilizó como molde para una reacción de PCR con oligos cebadores que incluyen sitios de restricción. El producto de PCR obtenido se clonó en LMP por digestión seguido de ligación con el vector. La secuencia complementaria a ING1b que utilizamos fue: ACCTTTGCGACTTGCGAGAGAAAT, (posición 77 a 99 respecto a ATG iniciador del exón 1b).

CONSTRUCCIÓN	INSERTO	ORIGEN
pLPC-AU5-ING1b	ING1b humano Proteína completa	(Goeman et al., 2005)
pLPC-AU5-ING1b 1-171	ING1b humano Aminoácidos 1 al 171	(Goeman et al., 2005)
pLPC-AU5-ING1b 172-279	ING1b humano Aminoácidos 172 al 279	(Goeman et al., 2005)
pLPC-AU5-ING1b W235A	ING1b humano Mutación W235A	Clonado durante este trabajo
pLPC-AU5-ING1b Y212A	ING1b humano Mutación Y212A	Clonado durante este trabajo
pLPC-Ras V12	Ha-Ras humano, mutado en el residuo 12 (G12V)	(Serrano et al., 1997)
LMP-ING1b	shARN complementario a ING1b humano	Clonado durante este trabajo
pCL-Eco	gag, pol, env ^{eco}	(Naviaux et al., 1996)
pCL-Ampho	gag, pol, env ^{ampho}	(Naviaux et al., 1996)
pLXSN-E6	Proteína E6 del virus HPV 16	(Halbert et al., 1991)
pLNC-ΔMEK1:ER	Fusión de MEK1 constitutivamente activo (ΔN3- S218E-S222D) y el dominio de unión a hormona del receptor de estrógenos (hbER)	(Kuo et al., 1996)
pWZL-Neo-EcoR	Receptor retroviral ecotrópico	(Serrano et al., 1997)

Tabla 1. Lista de vectores de expresión retroviral utilizados en este trabajo.

Clonaje de los mutantes puntuales de ING1b

Para la generación de estos mutantes usamos el kit de mutagénesis QuickChange Site-Directed de Stratagene. Siguiendo las instrucciones del kit, y un programa generado por Stratagene, generamos dos oligonucleótidos que contenían la mutación deseada en ING1b,

siendo cada uno complementario a cada una de las cadenas de ADN. Se realizó una reacción de PCR con la polimerasa *Pfu Turbo* a partir del vector pLPC-AU5-ING1b, introduciendo la mutación en los productos de PCR. Las hebras parentales se digirieron con la enzima DpnI, y los productos se transformaron en bacterias. Los primers diseñados fueron:

W235A directo: 5'-GAGTGCCCCATCGAGGCGTTCCACTTCTCGTG-3'

W235A reverso: 5'-CACGAGAAGTGGAAACGCCTCGATGGGGCACTC-3'

Y212A directo: 5'-CCCCAACGAACCCACGGCCTGTCTGTGCAACCAG-3'

Y212A reverso: 5'-CTGGTTGCACAGACAGGCCGTGGGTTCGTTGGGG-3'

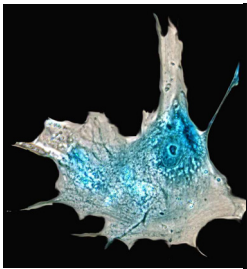
14. Anticuerpos

PROTEÍNA	ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
ATM fosforilado	Anti-phospho-ATM (Ser1981)	Policlonal conejo	1:1000	Upstate 05-740
Epítipo AU5	MMS-135R	Monoclonal ratón	1:500	Babco MMS-135R
DcR2	DcR2 pAb	Policlonal conejo	1:250	Stressgen AAP-371C
Histona γ -H2AX	JBW301	Monoclonal ratón	1:500	Upstate 05-636
HP1 γ	MAB3450	Monoclonal ratón	1:2000	Chemicon MAB3450
p53 humano	DO-1	Monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz sc-126
Ha-Ras	259	Monoclonal rata	1:100	Santa Cruz sc-35
ING1	LG-1	Policlonal conejo	1:1000 WB 1:500 IF	Generado en el laboratorio
p53 ratón	CM5	Policlonal conejo	1:500 WB 1:250 IF	Novocastra NCL-p53-CM5p
p16INK4A humano	JC8	Monoclonal ratón	1:5	Gordon Peters, CRUK, Reino Unido
p16INK4A ratón	M-156	Monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz sc-1207
p19ARF	R562	Policlonal conejo	1:500 WB 1:250 IF	Abcam Ab-80
p21 CIP1	C19	Policlonal cabra	1:500	Santa Cruz sc-397
H3K9Me3	07-442	Policlonal conejo	1:2000	Upstate 07-442
BrdU	BP40250	Policlonal conejo	1:1000	Megabase BP40250
β -Actina	AC-15	Monoclonal ratón	1:10000	SIGMA A5441

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios utilizados en este trabajo. Cuando un anticuerpo ha sido utilizado en varias técnicas, se indican las diluciones empleadas en las mismas (WB: *Western blot*, IF: inmunofluorescencia).

ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-Ig ratón-HRP	Policlonal cabra	1:5000	DAKO P 0447
Anti-Ig conejo-HRP	Policlonal burro	1:5000	Amersham NA934
Anti-Ig cabra-HRP	Policlonal conejo	1:3000	DAKO P 0160
Anti-Ig conejo-Alexa 488	Policlonal ratón	1:500	Invitrogen A11029
Anti-Ig ratón-Alexa 488	Policlonal cabra	1:500	Invitrogen A11059
Anti-Ig conejo-Alexa 594	Policlonal ratón	1:500	Invitrogen A11005
Anti-Ig ratón-Alexa 594	Policlonal cabra	1:500	Invitrogen A11062

Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo (HRP: peroxidasa de rábano).



Resultados

1. ING1b y senescencia celular en fibroblastos primarios humanos.

1.1. ING1b induce senescencia en fibroblastos primarios humanos

El primer paso de nuestro estudio fue caracterizar el efecto de la sobreexpresión de ING1b en fibroblastos primarios humanos. Para ello, mediante transducción retroviral expresamos ectópicamente ING1b fusionado al epítipo AU5, en células IMR90 de pase temprano. Como control, usamos un vector que expresa la versión activada del oncogén H-Ras (Ras V12), del que se sabe que produce una parada de ciclo celular, con características de senescencia en este tipo celular (Serrano et al., 1997). El diseño experimental que seguimos a lo largo de este trabajo para la expresión ectópica de proteínas mediante transducción retroviral y análisis fenotípico se esquematiza en la Figura 7.

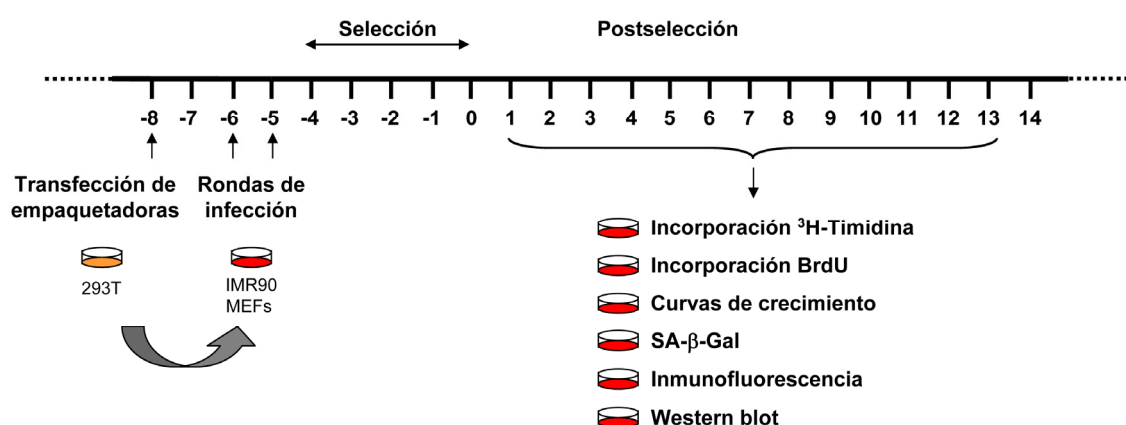


Figura 7. Diseño experimental para la sobreexpresión de proteínas en células primarias. Para la producción de partículas virales se utilizaron como empaquetadoras las células 293T. Dos días después de la transfección con los vectores retrovirales, se recogió el sobrenadante viral, y se añadió al cultivo de células primarias. Se hicieron tres rondas de infección, tras las cuales las células se sometieron a selección con antibiótico. Una vez terminada la selección, se realizaban los distintos experimentos.

Para analizar el efecto de estas construcciones en proliferación celular, medimos la incorporación de timidina tritiada en las células infectadas como estimación de su tasa de síntesis de ADN. Este análisis reveló que ING1b es un potente inhibidor de la síntesis de ADN en células IMR90 (Figura 8A). La expresión de ING1b se comprobó por análisis por *Western blot* e inmunofluorescencia (datos no mostrados). El efecto en proliferación se midió también a través de un ensayo de incorporación de BrdU mediante inmunofluorescencia, que reveló una relación inversa entre la expresión de ING1b y la incorporación de BrdU. Así, las células que expresaban ectópicamente ING1b no incorporaban BrdU, mientras que sólo se observó incorporación de BrdU en células que no expresaban ING1b exógeno (Figura 8B). Este dato apoya la idea del efecto antiproliferativo de la sobreexpresión de ING1b.

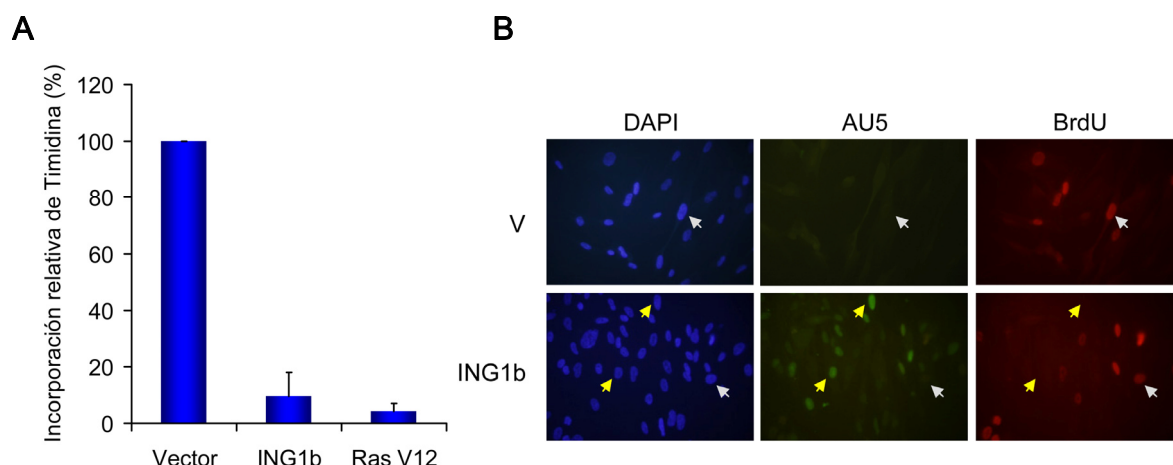


Figura 8. ING1b induce parada de ciclo celular en células IMR90. Células IMR90 que expresaban un receptor ecotrópico se transdujeron retroviralmente con vectores de expresión para ING1b y Ras V12. (A) Incorporación de Timidina tritiada como indicador de síntesis de ADN. Se muestran los valores medios y desviación estándar de tres experimentos independientes, donde el valor obtenido con el vector vacío se ha fijado arbitrariamente en 100%. (B) Incorporación de BrdU de células infectadas con ING1b o vector vacío, seguido de inmunofluorescencia anti BrdU (rojo) y anti AU5 (verde). Con flechas blancas se indican las células positivas para BrdU y negativas para la expresión de ING1b, y con flechas amarillas las células positivas para la expresión de ING1b y negativas para BrdU.

Dado el posible papel de ING1b en senescencia celular, quisimos determinar si la parada de ciclo observada se acompañaba de la aparición de marcadores de senescencia. Los fibroblastos senescentes adquieren una morfología característica, desarrollando una forma plana y de mayor tamaño, en contraposición con la forma alargada y fina de las IMR90 de pase temprano y en división activa (ver introducción). La infección con ING1b dio lugar a

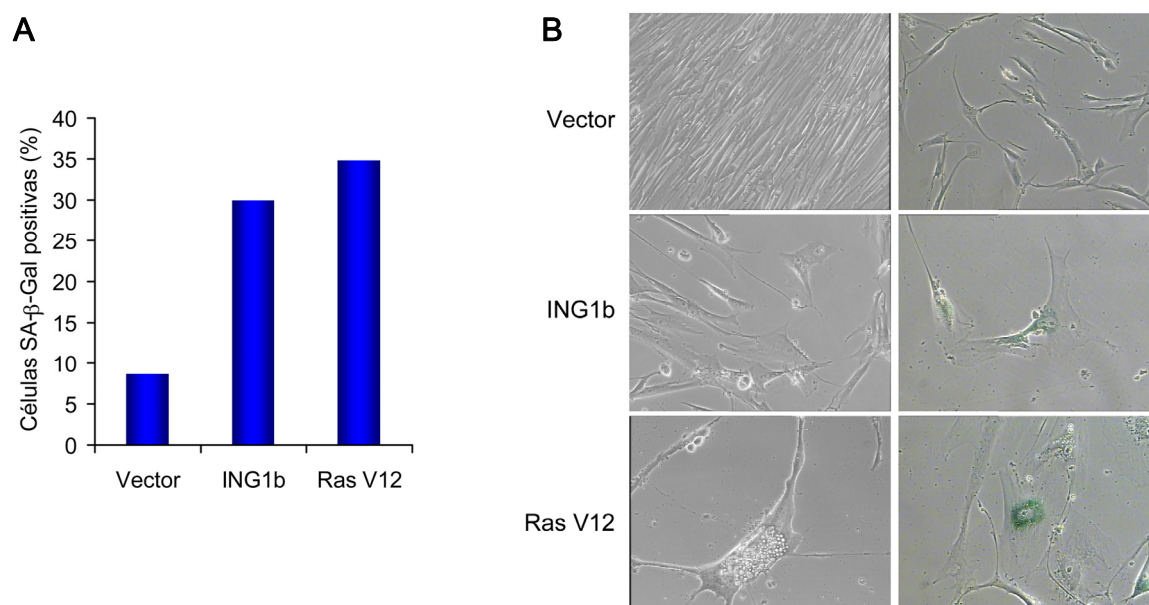


Figura 9. ING1b induce senescencia celular. (A) Tinción SA-β-Gal en las células infectadas con ING1b y Ras V12. Se muestra el porcentaje de células positivas para SA-β-Gal para cada infección, en un experimento representativo. (B) Imágenes de contraste de fase donde se muestra la morfología (columna izquierda) y la tinción SA-β-Gal (columna derecha) de las células infectadas y sembradas a baja densidad.

un cambio a morfología senescente (citoplasma extendido, forma plana y nucleolos marcados) analizado por microscopía de contraste de fase (Figura 9B, panel izquierdo). Las células senescentes poseen una actividad enzimática β -Galactosidasa específica dependiente de pH, a la que se ha llamado SA- β -Gal (Dimri et al., 1995). Analizamos la presencia de esta actividad en las células infectadas, utilizando las células que expresan Ras V12 como control, y observamos que ING1b es capaz de inducir SA- β -Gal en fibroblastos humanos en un grado similar al de Ras V12 (Figura 9A y 9B, panel derecho).

Estos resultados indican que la expresión ectópica de ING1b tiene un efecto antiproliferativo en fibroblastos primarios humanos, con características de senescencia celular.

1.2. ING1b induce senescencia celular de forma dependiente de p53

Las vías de p53 y Rb juegan un papel crítico en el control de senescencia en células humanas (ver Introducción). Dado que ING1b está conectado funcionalmente a p53, quisimos determinar si ING1b necesita a p53 para inducir senescencia. Para este objetivo, generamos células IMR90 deficientes en p53, mediante la infección de las mismas con un vector que expresa la proteína E6 del virus HPV (*Human Papilloma Virus*, virus del papiloma humano), que se ha caracterizado que se une a p53 e induce su degradación (Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008). Las células infectadas con E6 fueron de nuevo infectadas con vector vacío, ING1b, y Ras V12 como control.

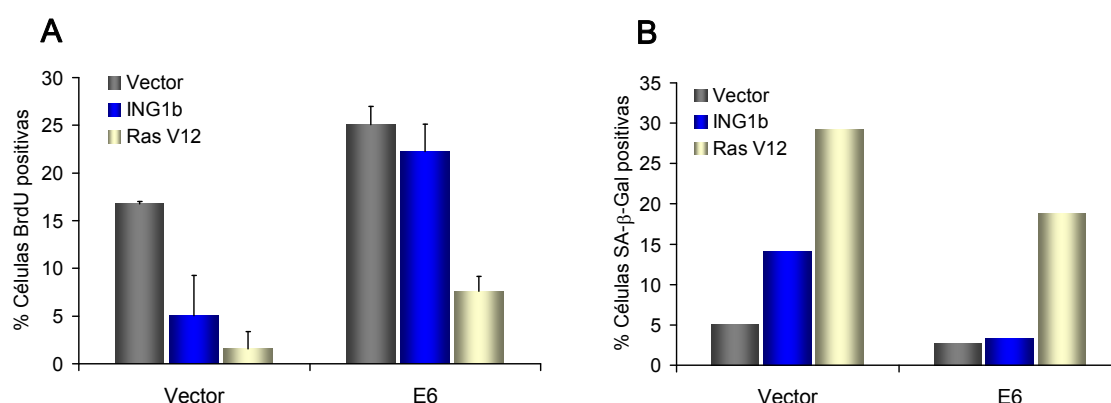


Figura 10. ING1b induce senescencia celular de forma dependiente de p53. (A) Las células IMR90 se sometieron a dos rondas de infección. En primer lugar, con vector vacío o con un vector de expresión de la proteína E6 de HPV. Una vez seleccionadas, se infectaron con ING1b, Ras V12 o su correspondiente vector vacío. (A) Análisis de incorporación de BrdU en las células doblemente infectadas. Se muestran los valores medios y la desviación estándar de dos experimentos independientes, realizados a día 6 postselección. (B) Tinción de SA- β -Gal en las células doblemente infectadas. Se muestra un experimento representativo realizado a día 6 postselección.

Para ver si la inactivación de p53 evitaba la parada de ciclo inducida por la sobreexpresión de ING1b, realizamos un ensayo de incorporación de BrdU en las células doblemente infectadas. Observamos que las células que expresaban E6, tras la sobreexpresión de ING1b, mostraban una tasa de incorporación de BrdU similar a la de los controles de vector vacío, en contraste con la clara disminución en la tasa de BrdU que mostraban las células con p53 funcional tras la sobreexpresión de ING1b (Figura 10A).

Para ver si la inducción de marcadores de senescencia por ING1b se veía comprometida por la inactivación de p53, realizamos un ensayo de actividad SA- β -Gal en las células doblemente infectadas. Las células que expresan E6 no mostraron una inducción significativa de la actividad SA- β -Gal tras la sobreexpresión de ING1b (Figura 10B). Estas células, tras la infección con Ras V12, sufrían un descenso en la incorporación de BrdU, y un aumento en la actividad SA- β -Gal, aunque no tan dramático como en el caso de las células con p53 funcional, consistente con la idea de que para evadir la senescencia inducida por Ras V12 es necesario inactivar conjuntamente las vías de p53 y Rb (Serrano et al., 1997).

Estos resultados indican que ING1b necesita la presencia de p53 funcional para inducir parada de ciclo y senescencia.

1.3. Los niveles de ING1b endógeno aumentan durante la senescencia inducida por estrés oncogénico

A la vista de los resultados obtenidos con la expresión ectópica de ING1b, la siguiente cuestión que quisimos abordar fue si la proteína ING1b endógena juega un papel durante la entrada en senescencia por estrés oncogénico. Para ver si los niveles de proteína se veían afectados durante esta respuesta, infectamos células IMR90 con Ras V12, y sometimos a las células infectadas a análisis por *Western blot*. La hibridación con un anticuerpo generado contra el extremo C-terminal de ING1 reveló que los niveles de ING1b endógeno aumentan tras la sobreexpresión de Ras V12 (Figura 11A).

Para confirmar este resultado, utilizamos un segundo abordaje, en el que utilizamos células IMR90 que expresan la proteína MEK1 constitutivamente activa fusionada al dominio de unión a hormona del receptor de estrógenos (Δ MEK1:ER), haciendo la actividad del mismo inducible por el análogo de estrógenos tamoxifeno (4-OHT). MEK1 es un efector de la vía de Ras, y la expresión de la proteína activada, al igual que Ras V12, induce senescencia en este tipo celular (Narita et al., 2003). Sometimos a estas células a inducción con concentraciones crecientes de tamoxifeno, y análisis por *Western blot*. En este sistema también pudimos observar que los niveles de ING1b aumentaban tras la inducción de estrés oncogénico (Figura 11B).

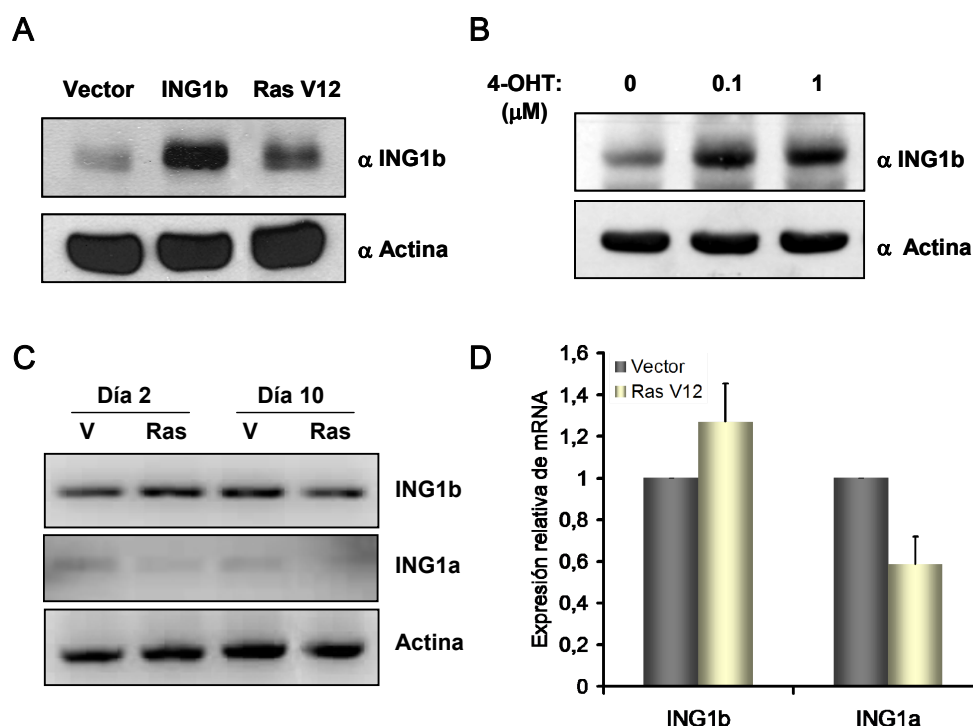


Figura 11. ING1b se induce con estrés oncogénico. (A) Análisis por Western blot de los niveles de ING1b en IMR90 infectadas con vector vacío, ING1b y Ras V12. Los lisados celulares se realizaron a día 6 postselección. La hibridación se realizó con un anticuerpo diseñado contra ING1 (LG-1). (B) Células IMR90 MEK1:ER se trataron con 0,1 y 1 μ M de tamoxifeno. Seis días después de la inducción se realizaron lisados celulares y se analizaron los niveles de ING1b por Western blot. (C) RT-PCR de ING1a e ING1b en células IMR90 infectadas con vector vacío o con Ras, a los tiempos post-selección indicados. (D) PCR cuantitativa de los transcritos de ING1a e ING1b en IMR90 infectadas con las construcciones indicadas. Se representa la media y desviación estándar correspondientes a dos infecciones independientes a día 2 postselección.

Recientemente se ha propuesto que ING1a, producto alternativo del locus ING1, aumenta sus niveles durante la senescencia replicativa, mientras que los niveles ING1b disminuyen en esta respuesta (Soliman et al., 2008). Para analizar la regulación de los dos productos del locus en senescencia inducida por estrés oncogénico, extrajimos ARN de células infectadas con vector vacío y Ras V12, a dos tiempos postinfección. Realizamos RT-PCR de ING1a e ING1b sobre estos ARNs, y pudimos observar que los niveles de mensajero de ING1b no aumentan significativamente con la expresión de Ras V12. La expresión de ING1a era difícilmente detectable, y se veía ligeramente disminuida tras la expresión de Ras oncogénico (Figura 11C). Analizamos la expresión de los transcritos por PCR cuantitativa, y de forma consistente con los experimentos de RT-PCR, observamos que la expresión de ING1a disminuía en las células con Ras un 40% aproximadamente, mientras que la expresión de ING1b no aumentaba significativamente por la expresión de Ras oncogénico (Figura 11D). Estos resultados sugieren que las variaciones en proteína no se relacionan con cambios a nivel de ARN mensajero, abriendo la posibilidad de que exista regulación a nivel postranscripcional.

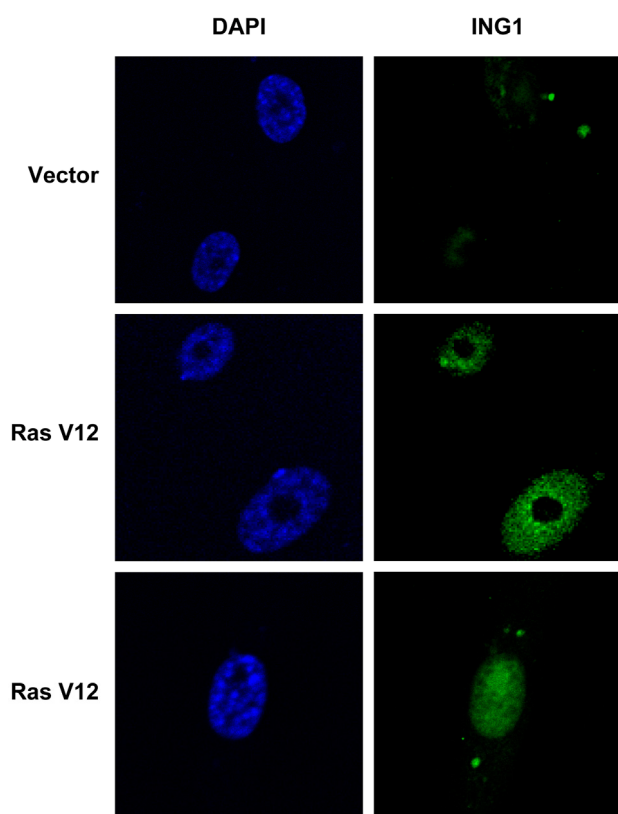


Figura 12. El aumento de ING1 se detecta por inmunofluorescencia. Se muestran imágenes de microscopía confocal en las cuales las células IMR90 infectadas con Ras V12 se han sometido a análisis por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo LG1.

Realizamos experimentos de inmunofluorescencia con células IMR90 infectadas con vector vacío y Ras V12, usando el anticuerpo anti-ING1, con el que observamos que las células que expresan Ras V12 muestran una mayor tinción con dicho anticuerpo (Figura 12). Dado que el epítipo utilizado para la generación del anticuerpo corresponde a la zona C-terminal común a ambas isoformas, no podemos distinguir si la señal de inmunofluorescencia se debe a ING1b o ING1a. Sin embargo, dados los resultados de la RT-PCR, la PCR cuantitativa y los de *Western blot*, consideramos que la hipótesis mas probable es que el aumento de señal se debe, al menos mayoritariamente, a ING1b.

Por tanto, ING1b aumenta sus niveles en respuesta a estrés oncogénico, y puede que este aumento se deba a una estabilización postranscripcional.

1.4. ING1b es necesario para la entrada en senescencia inducida por estrés oncogénico.

Una vez que determinamos que ING1b puede inducir senescencia celular, y que se regula durante la entrada en senescencia por estrés oncogénico, nos preguntamos si esta proteína era necesaria para la entrada en senescencia inducida por oncogenes.

Para analizar el efecto de la pérdida de función de ING1b, utilizamos la tecnología de ARN de interferencia. Generamos un vector retroviral basado en el microARN mir30 (LMP), que expresa *shRNAs* contra el exón 1b del locus ING1 humano, de forma que inactiva de forma específica ING1b (Figura 13A). El efecto de la interferencia lo analizamos por *Western blot* (Figura 13B).

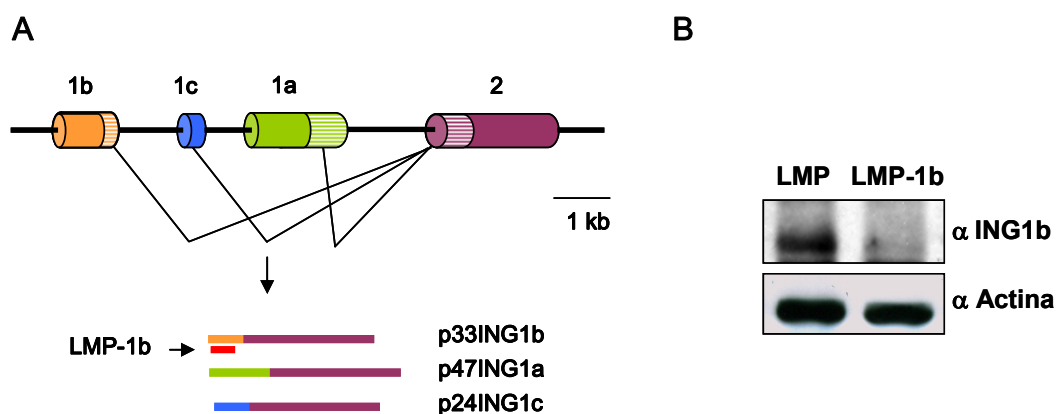


Figura 13. Interferencia del locus *ING1* humano (A) Representación esquemática del locus. Las zonas codificantes para proteína se encuentran rayadas. Se generó un vector retroviral para la expresión de ARNs de interferencia contra el exón 1b, indicados con flechas. (B) Análisis de la eficiencia de la interferencia por Western blot en IMR90 infectadas con el vector vacío o con LMP-1b, usando un anticuerpo anti-ING1.

Mediante transducción retroviral, introdujimos este vector en células IMR90 inducibles para MEK1 por tamoxifeno (ver apartado 1.3.), generando líneas estables en las que podíamos inducir estrés oncogénico en condiciones de deficiencia en ING1b. Para determinar si la parada de ciclo asociada a senescencia inducida por MEK1 se veía afectada, realizamos curvas de crecimiento de estas células tras la administración de tamoxifeno. Como esperábamos, las células con vector vacío sufrían un claro descenso en la proliferación tras la inducción de MEK1, en comparación con las tratadas con etanol. Sin embargo, las

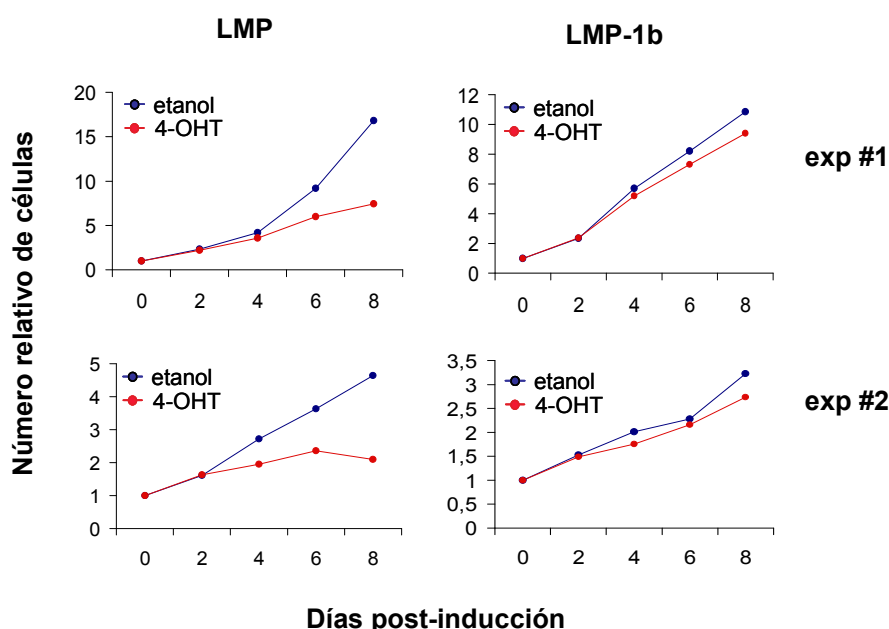


Figura 14. La interferencia de ING1b evita la parada asociada a estrés oncogénico. Las células IMR90 inducibles para MEK1 se infectaron con los vectores de interferencia señalados. Las células infectadas se trataron con 1 μ M de tamoxifeno o con etanol. Se analizó la proliferación de dichas células mediante la realización de curvas de crecimiento, hasta 8 días post-inducción. El número de células antes de añadir el tamoxifeno se fijó en 1. Se muestran dos experimentos independientes.

células donde ING1b había sido interferido no cesaban su proliferación, manteniendo una cinética de crecimiento similar a la de sus controles (Figura 14).

Por tanto, el silenciamiento específico de ING1b permite la evasión de la parada de ciclo asociada a senescencia inducida por estrés oncogénico en fibroblastos humanos.

2. Papel de *Ing1* en senescencia en fibroblastos primarios de ratón.

2.1. Caracterización de un modelo animal de deficiencia en *Ing1*.

Dado que ING1b es necesario para la inducción de senescencia por estrés oncogénico en células humanas, nos pareció interesante estudiar este proceso en un modelo de deficiencia de *Ing1* en ratón.

Nuestro siguiente abordaje fue el análisis de MEFs gene-trap para *Ing1*. Estos MEFs proceden de ratones transgénicos donde el locus *Ing1* ha sido interrumpido por la inserción de un casete gene-trap (generados en el laboratorio de Ernst-Martin Fuchtbauer, Universidad de Aarhus, Dinamarca). Este casete consiste en un fuerte aceptor de procesamiento de ARN (aceptor de procesamiento o *splicing*, AS), seguido de una fusión sin promotor del gen reportero β -gal y el gen de resistencia a Neomicina (β -Geo) y finalmente una cola poli-A. La inserción de este casete dentro de un locus interrumpe el procesamiento normal del mismo, generando transcritos truncados, productos del procesamiento de los exones situados en 5' del casete con el casete gene-trap (Stanford et al., 2006).

El locus *Ing1* de ratón contiene cuatro exones (1a, 1b, 1c y 2), que dan lugar a tres transcritos distintos a través del procesamiento alternativo de su ARNm (ver Introducción). En nuestro caso, la inserción del casete se produjo en el intrón comprendido entre los exones 1b y 1c, a 67 pb del comienzo de exón 1c (Figura 15A, comunicación personal de E-M Fuchtbauer).

Como primer paso, analizamos la expresión de los diferentes transcritos del locus mediante RT-PCR, tanto en MEFs de fenotipo silvestre (wild type, wt) como en fibroblastos con el casete β -geo introducido en uno (+/g), o en los dos alelos (g/g). Este análisis mostró que la expresión de los tres transcritos alternativos del locus: 1a/2, 1b/2 y 1c/2 está reducida significativamente en los MEFs g/g (Figura 15B). No se produce la anulación total de la expresión de 1a/2 y 1b/2, debido seguramente al procesamiento residual del transcrito silvestre del locus alrededor del AS del casete. El efecto tan dramático sufrido por el transcrito 1c/2 se debe probablemente a que el casete β -geo se ha insertado interrumpiendo las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción del promotor del exón 1c. Para

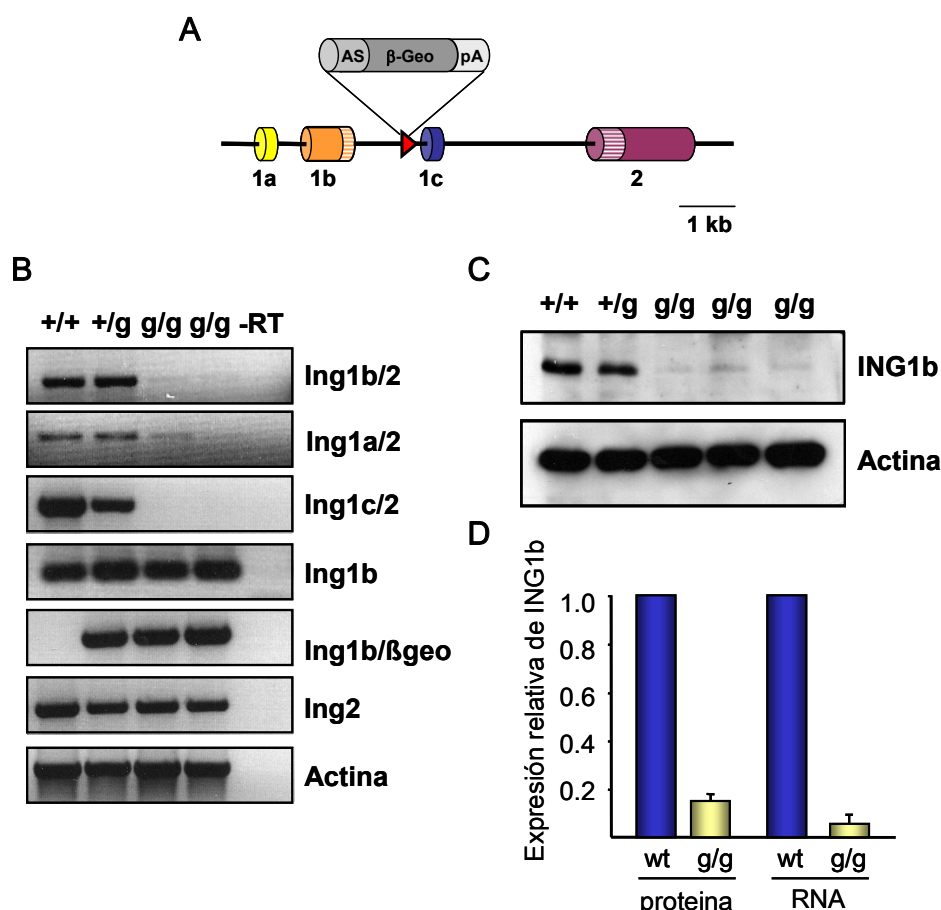


Figura 15. Expresión de los productos del locus *Ing1* en los MEFs gene-trap. (A) Representación esquemática del locus *Ing1*. Las regiones codificantes para proteína en los exones 1b y 2 se muestran rayadas. El sitio de integración del casete β -geo se indica con una punta de flecha. (B) Análisis por RT-PCR de la expresión de los transcritos alternativos del locus *Ing1*. Ing1b/ β geo representa el transcrito fusión entre el exón 1b de *Ing1* y el casete gene-trap. Se muestran datos para MEFs de genotipo silvestre (+/+) y con la inserción del casete gene-trap en uno (+/g) o dos alelos (g/g) de *Ing1* (C) Análisis por Western blot de la expresión de ING1b en MEFs de los genotipos indicados. (D) Cuantificación de los niveles de proteína y RNA de ING1b. Los niveles de RNA se cuantificaron usando PCR a tiempo real. En ambos casos, se utilizó actina para la normalización.

descartar que hubiera compensación por otros miembros de la familia, analizamos también la expresión de *Ing2*, el miembro de la familia más relacionado con *Ing1*, y pudimos comprobar que los niveles no se veían afectados en las células gene-trap.

Se predice que la traducción de estos transcritos produce dos péptidos: ING1b (desde el ATG contenido en el exón 1b), e ING1c (desde un ATG interno en el exón 2) (Zeremski et al., 1999), aunque en nuestras manos nunca se ha detectado la expresión de la proteína ING1c en MEFs silvestres. El análisis de los MEFs g/g por *Western blot*, de forma consistente con los datos de RT-PCR, mostró una banda muy débil con la misma movilidad que ING1b (Figura 15C). El estudio por RT-PCR cuantitativa reveló que la expresión del transcrito 1b/2 en los MEFs g/g es aproximadamente un 5% de la expresión en los MEFs salvajes. De igual forma, los niveles de proteína de ING1b en los MEFs g/g se ven reducidos a un 15% de los niveles normales (Figura 15D).

Estos datos demuestran que la inserción del casete gene-trap en el locus *Ing1* produce una drástica disminución de la expresión de sus transcritos y de la proteína ING1b, y validan a los MEFs homocigotos para la inserción del casete β -geo (MEFs g/g) como un buen modelo celular para estudiar los efectos de la deficiencia de *Ing1*.

2.2. Los MEFs deficientes en *Ing1* tienen alterada la inducción de senescencia en respuesta a Ras oncogénico.

Una vez validado el modelo experimental, nos dispusimos a explorar el efecto de la inactivación de *Ing1* en la entrada en senescencia por estrés oncogénico. En el caso de los fibroblastos de ratón, esta respuesta está mediada principalmente por la vía de ARF-p53. (Serrano et al., 1997; Palmero et al., 1998).

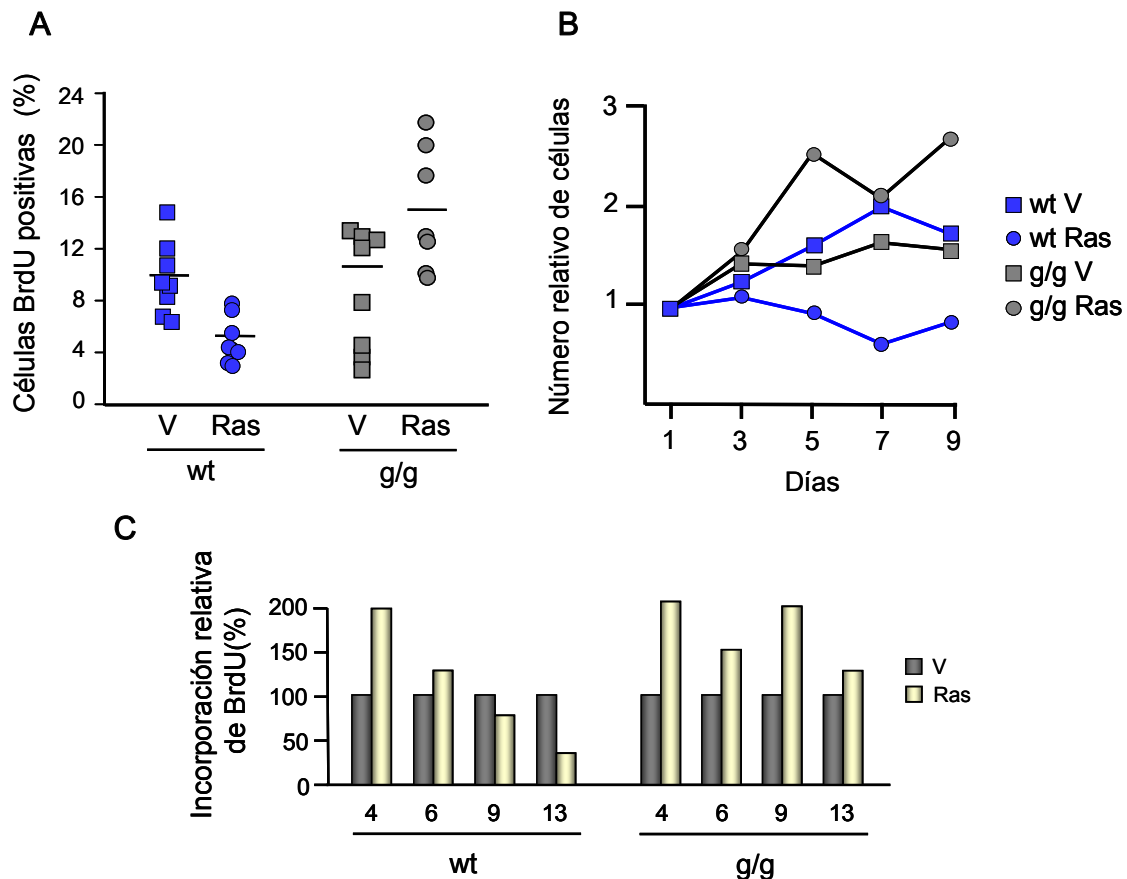


Figura 16. Respuesta de los MEFs g/g en proliferación tras estrés oncogénico. (A) Tasa de incorporación de BrdU en MEFs de los genotipos indicados, infectados con vector vacío o con un vector que expresa Ras V12, a 6 días postselección. Cada punto corresponde a una preparación de MEFs diferente, y la barra horizontal representa la media (B) Curva de crecimiento de MEFs wt (azul) y g/g (gris), tras la infección con vector vacío (cuadrados), o Ras V12 (círculos). Se contó el número de células en los tiempos postselección indicados, y se representa el número de células relativo a día 1. (C) Tasa de incorporación de BrdU en MEFs de ambos genotipos, infectados con vector vacío o Ras V12, a los días post-selección indicados. Se muestra un experimento representativo.

Infectamos MEFs de pase temprano de ambos genotipos (wt y g/g) con Ras V12, y estimamos la tasa de replicación de ADN de las células infectadas contando el número de células positivas para la incorporación de BrdU, mediante inmunofluorescencia. Como se esperaba, los MEFs salvajes infectados con Ras sufrieron una reducción en el número de células BrdU positivas con respecto a su control de infección con vector vacío. En cambio, los MEFs g/g se mostraban resistentes a la infección por Ras, conservando un número de células positivas similar o incluso mayor al de su control (Figura 16A). Esta insensibilidad a Ras también fue evidente cuando monitorizamos la tasa de proliferación a distintos tiempos después de la infección, mediante curvas de crecimiento y ensayos de incorporación de BrdU durante un periodo de hasta 13 días postselección (Figura 16B y 16C). Mientras que los MEFs wt infectados con Ras prácticamente no se dividen, los MEFs g/g en respuesta a Ras muestran una tasa de proliferación ligeramente mayor que sus controles de vector vacío (Figura 16B y 16C).

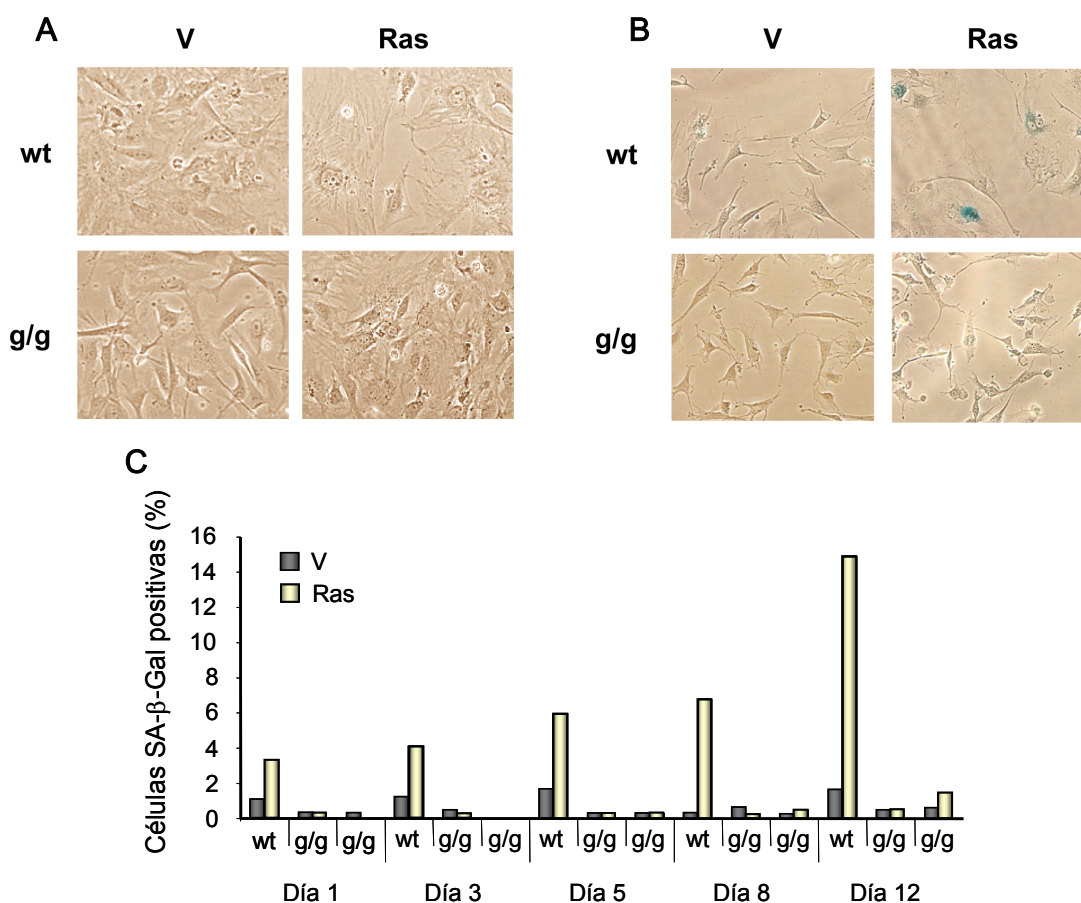


Figura 17. Inducción de marcadores de senescencia en MEFs gene-trap tras estrés oncogénico. (A) Imágenes de microscopía de contraste de fases mostrando la morfología de MEFs de los genotipos indicados tras la infección con vector vacío o Ras V12, a día 6 postselección. Aumento de 100X. (B) Imágenes de contraste de fases de células de ambos genotipos infectadas con vector vacío y Ras V12, fijadas y teñidas para SA-β-Gal, a día 8 postselección. Aumento de 100X. (C) Porcentaje de MEFs g/g o wt SA-β-Gal positivos, infectados con vector vacío y Ras V12, a los tiempos post-selección indicados. Se muestra un experimento representativo con una preparación de MEFs wt y dos g/g.

Además, mientras que los MEFs salvajes infectados con Ras adquirían una morfología senescente y mostraban actividad SA- β -Gal, los MEFs g/g analizados al mismo tiempo post-infección conservaban morfología normal y ausencia de tinción SA- β -Gal después de la infección con Ras V12. Este efecto se observó también a distintos tiempos postinfección (Figura 17, A, B y C).

Para estudiar las bases moleculares de esta respuesta deficiente a Ras oncogénico, analizamos por *Western blot* los niveles de varias proteínas implicadas en senescencia inducida por Ras. En MEFs, la respuesta antiproliferativa a Ras oncogénico comúnmente se acompaña de una estabilización de p53 mediada por el aumento en los niveles de p19ARF (Palmero et al., 1998). En los MEFs g/g la inducción de p19ARF por Ras es similar a la producida en MEFs wt, lo que implica que la maquinaria que une el estrés oncogénico con la activación de p19ARF no se ve afectada por la deficiencia de ING1b (Figura 18A). De igual forma, los reguladores de ciclo celular p16INK4a y p21CIP1 aumentan sus niveles tras la infección de forma similar en ambos genotipos (Figura 18A). Sin embargo, en las células g/g, la sobreexpresión de Ras V12 no produce un aumento de p53 al mismo nivel que en las células wt (Figura 18B). Analizamos por *Western blot* el marcador de senescencia y diana de p53 Dcr2 (Collado and Serrano, 2006), observando que en los MEFs g/g no se inducía al mismo nivel que en los MEFs wt (Figura 18A). Este dato apoya la idea de que estas células tienen afectada la entrada en senescencia y la actividad de p53 en respuesta a estrés oncogénico.

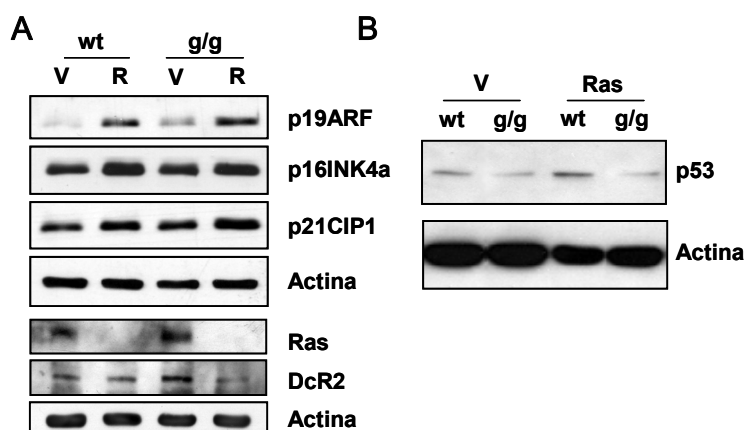


Figura 18. Expresión de marcadores de senescencia en MEFs g/g. Análisis por Western blot de los niveles de p19ARF, p16INK4a, p21CIP1 y Dcr2 (A) y de p53 (B) en MEFs wt y g/g tras la sobreexpresión de Ras V12, a día 6 postselección. Se muestra la expresión ectópica de Ras como control (A).

Mediante inmunofluorescencia analizamos los niveles de p19ARF y p53 en las células de ambos genotipos con Ras, confirmando los datos obtenidos por *Western blot*. Además, este análisis nos mostró que la deficiencia en *Ing1* no supone un cambio de localización de ninguna de las dos proteínas, de forma basal o tras la inducción de estrés oncogénico (Figura 19).

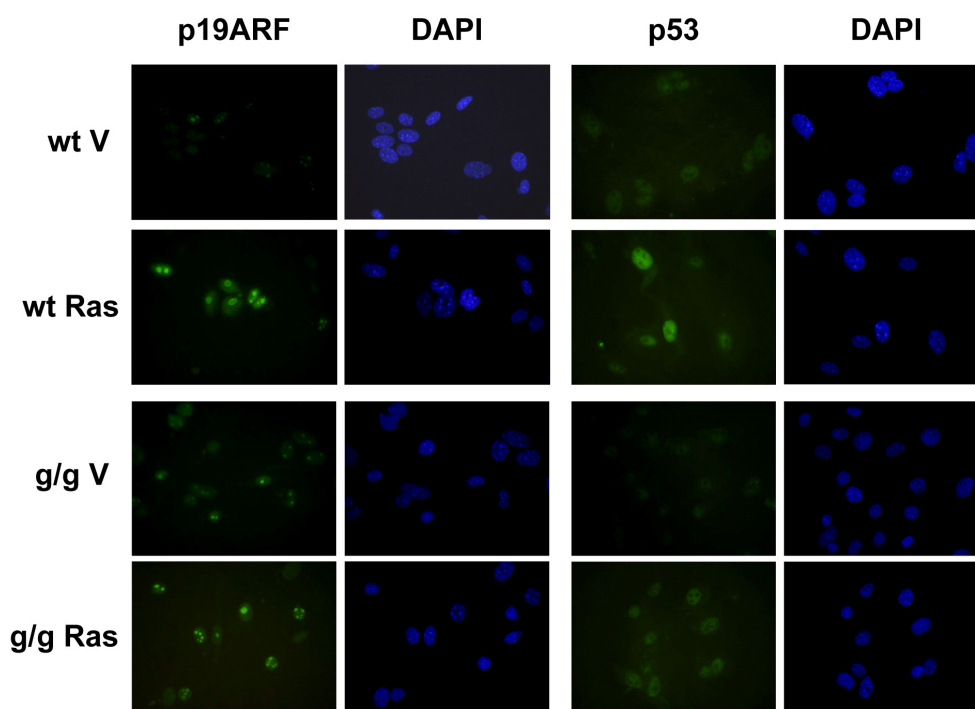


Figura 19. Inducción y localización de p19ARF y p53 en MEFs gene-trap. Imágenes de microscopía de fluorescencia, en las que se muestra el análisis mediante inmunofluorescencia de los niveles endógenos de p19ARF (panel izquierdo) y p53 (panel derecho), en MEFs wt y g/g tras la infección con un vector vacío o un vector que expresa Ras V12. Los datos corresponden a día 6 postselección.

La siguiente cuestión por resolver era si la sobreexpresión de Ras en los MEFs *Ing1*-nulos suponía la transformación de los mismos. Con este objetivo, inyectamos subcutáneamente células infectadas con Ras V12 en ratones desnudos, y observamos la aparición de tumores en estos ratones durante un periodo de 40 días. La inyección de MEFs g/g o wt infectados con Ras no produjo la formación de tumores, mientras que MEFs p53 nulos infectados con Ras (usados como control positivo de transformación) eran capaces de inducir la formación de tumores visibles en este periodo de tiempo (Figura 20).

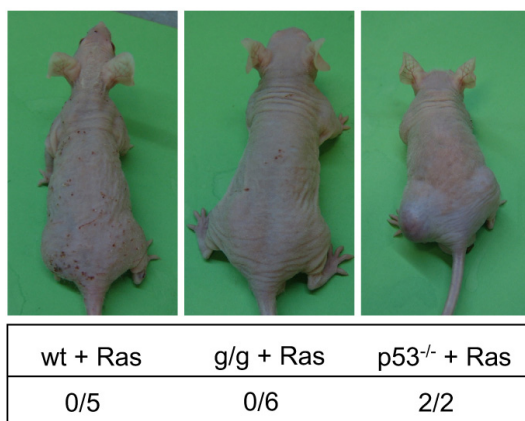


Figura 20. Capacidad tumorigénica de los MEFs gene-trap. MEFs wt, g/g y p53 nulos se infectaron con Ras oncogénico o vector vacío, y se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones desnudos *nu/nu* (4×10^5 células por inyección). Se analizó la aparición de lesiones visibles cada tres días, durante un periodo de 6 semanas. Se muestran animales representativos de cada genotipo, 25 días después de la inyección. Se representa el número de tumores visibles respecto del número total de inyecciones.

Dado que los MEFs deficientes en *Ing1* muestran resistencia a la senescencia inducida por Ras, quisimos determinar si también tenían afectadas la entrada en senescencia replicativa o la tasa de immortalización. Para ello, sometimos a MEFs de ambos genotipos a un protocolo de pases seriados 3T3, a través del cual observamos que los MEFs g/g entraban en senescencia y se immortalizaban de forma similar a los MEFs wt (Figura 21).

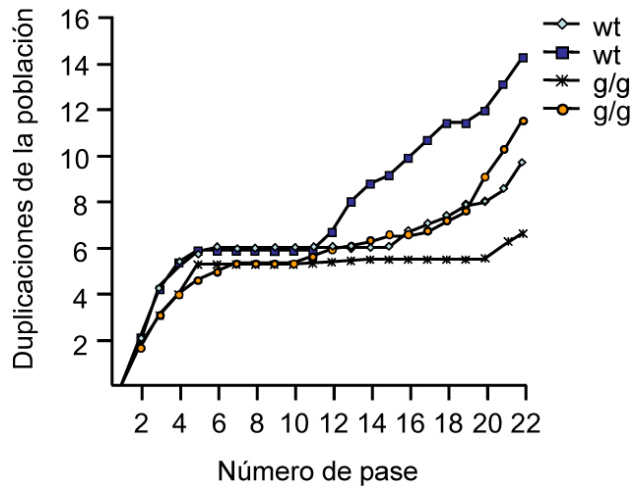


Figura 21. Senescencia replicativa e immortalización de los MEFs g/g. Dos preparaciones independientes de ambos genotipos de pase temprano se sometieron a un protocolo de pases seriados 3T3. Las células se contaron en cada pase, y el número de duplicaciones de la población se calculó usando la fórmula $PDL=3.32(\log N_f - \log N_i)$, donde N_i es el número de células plaqueadas y N_f es el número de células contadas tres días después de cada punto.

De forma consistente con los datos anteriores, los MEFs g/g infectados con vector vacío o con Ras V12 no son capaces de formar colonias cuando son plaqueados a baja densidad, en las mismas condiciones que los MEFs p53-nulos infectados con Ras V12 forman colonias (Figura 22). Por tanto, la deficiencia de *Ing1* no parece aportar una ventaja en immortalización ni transformación por oncogenes.

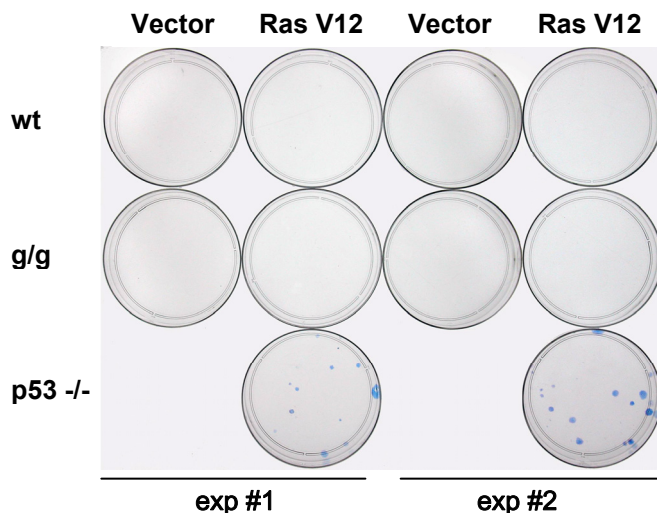


Figura 22. Los MEFs deficientes en *Ing1* no forman colonias tras la expresión de Ras V12. MEFs de ambos genotipos infectados con vector vacío o con Ras V12 se sembraron a baja densidad (2000 células/placa 10 cm), por triplicado, y se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas. Como control positivo de formación de colonias, utilizamos MEFs p53 nulos infectados con Ras V12. Se muestran placas representativas de dos experimentos independientes

Nuestros datos indican que la deficiencia en *Ing1* en MEFs produce una entrada deficiente en senescencia inducida por Ras V12, acompañada de un defecto en acumulación de p53.

3. Conexión entre ING1 y cromatina durante senescencia celular.

Como se ha comentado en la introducción, ING1b y otros miembros de la familia ING están relacionados con la maquinaria de remodelación de cromatina y formación de heterocromatina. Dado que la entrada en senescencia implica cambios en la estructura de cromatina, y nuestros resultados demuestran que ING1b juega un papel en inducción de senescencia, quisimos explorar distintos aspectos relacionados con el posible papel de ING1b en represión transcripcional y remodelación de cromatina, en el contexto de senescencia celular.

3.1. La capacidad de ING1b de inducir parada de ciclo se relaciona con su capacidad de represión transcripcional.

ING1b, como se ha expuesto anteriormente, tiene varios dominios en su estructura asociados a diferentes funciones de la proteína. El siguiente paso de nuestro estudio fue el determinar qué dominios y funciones de ING1b estaban implicados en la inducción de senescencia. Para ello, utilizamos vectores retrovirales que expresan dos mutantes de delección de la proteína fusionados al epítipo AU5, representando uno la parte N-terminal (aminoácidos 1-171), y el segundo la parte C-terminal (aminoácidos 172-279) (Figura 23A).

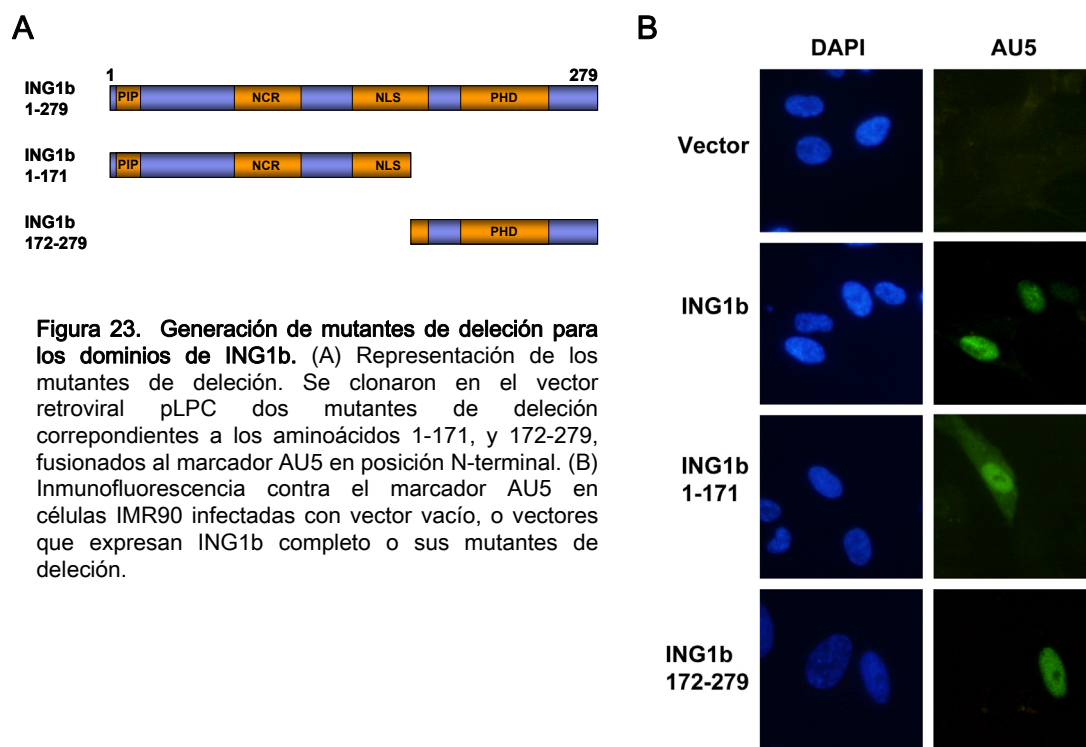


Figura 23. Generación de mutantes de delección para los dominios de ING1b. (A) Representación de los mutantes de delección. Se clonaron en el vector retroviral pLPC dos mutantes de delección correspondientes a los aminoácidos 1-171, y 172-279, fusionados al marcador AU5 en posición N-terminal. (B) Inmunofluorescencia contra el marcador AU5 en células IMR90 infectadas con vector vacío, o vectores que expresan ING1b completo o sus mutantes de delección.

Analizamos la expresión de estas construcciones en células IMR90 por inmunofluorescencia (Figura 23B) y por *Western blot* (datos no mostrados). Comprobamos que estas construcciones se expresan y se detectan en el núcleo, aunque también, en distinta proporción, en citoplasma (de forma más evidente en la construcción N-terminal). Esta localización se debe seguramente a que ambas presentan de forma incompleta el dominio de localización nuclear.

Para determinar el efecto de estas construcciones en proliferación, las expresamos ectópicamente en células IMR90 por transducción retroviral, junto con las construcciones de ING1b completo y Ras V12 como controles. A continuación, medimos la incorporación de timidina tritiada en las células infectadas, y observamos que la delección de cualquiera de los

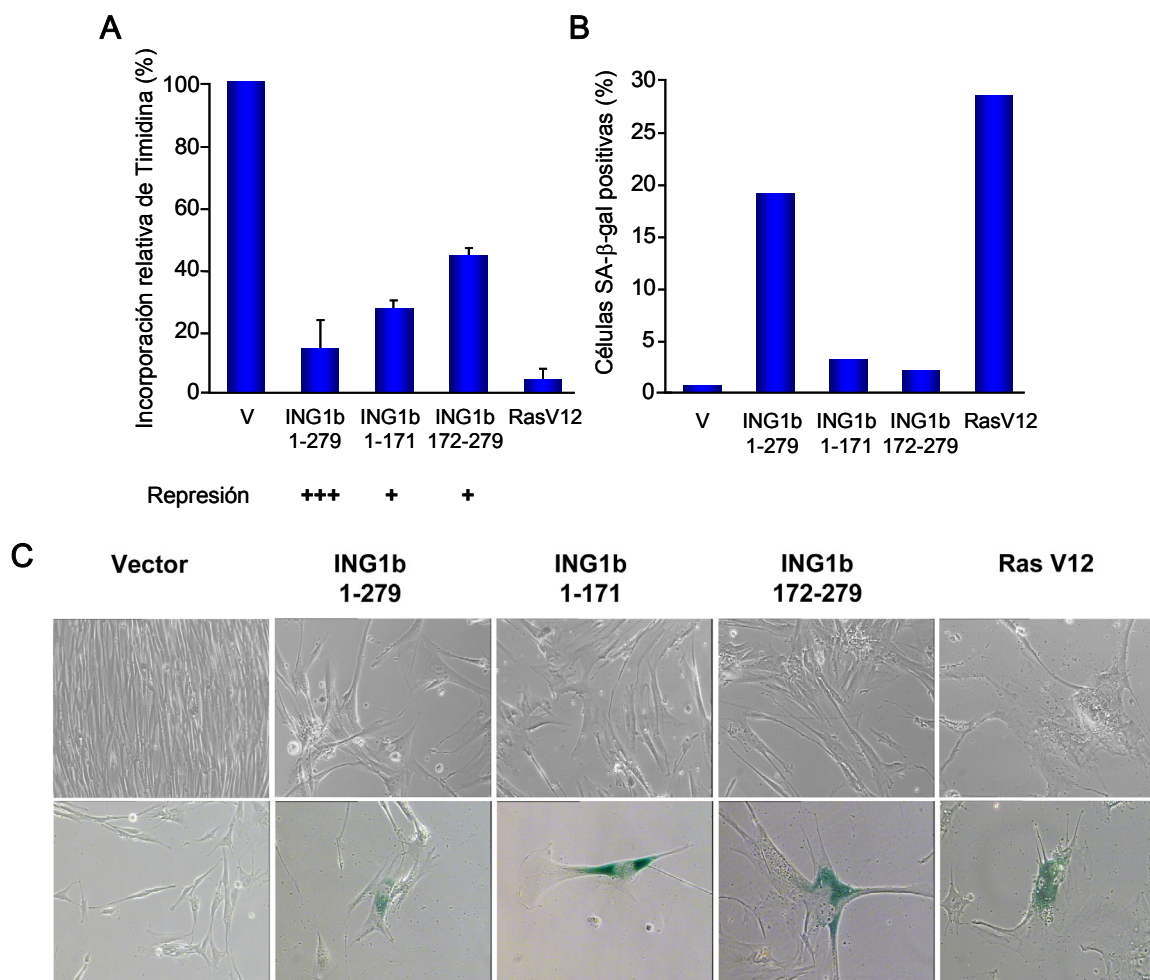


Figura 24. Efecto de la delección de los dominios de ING1b en inducción de senescencia en fibroblastos humanos. Células IMR90 que expresaban un receptor ecotrópico se transdujeron retroviralmente con vectores de expresión para Ras V12, ING1b completo, y las delecciones de ING1b indicadas. (A) Incorporación de Timidina tritiada como indicador de síntesis de ADN. Se muestran los valores medios y desviación estándar de tres experimentos independientes, donde el valor obtenido con el vector vacío se ha fijado en 100%. Se representa también el grado de represión transcripcional que se obtuvo con las distintas construcciones. (B) Porcentaje de células SA-β-Gal positivas para cada infección, en un experimento representativo. (C) Imágenes de contraste de fase donde se muestra la morfología de las células infectadas con las construcciones que se indican (panel superior), y la tinción Sa-β-Gal de las células infectadas con las construcciones indicadas (panel inferior).

dos dominios resultó en una reducción parcial de la capacidad de ING1b de provocar parada en estas células (Figura 24A). Por separado, ambos dominios de la proteína fueron capaces de inducir SA- β -Gal, pero en mucha menor medida que ING1b completo, indicando que ambos son necesarios para la inducción de este marcador (Figura 24B y C). Las deleciones N-terminal y C-terminal inducen de forma atenuada un cambio de morfología, de acuerdo con su capacidad disminuida de parar el ciclo celular (Figura 24C).

En paralelo a estos experimentos, el laboratorio de Aria Baniahmad (Universidad de Jena, Alemania) realizó ensayos de represión transcripcional usando la fusión de ING1b completo y sus mutantes de deleción con el dominio de unión a ADN de Gal4 (Baniahmad et al., 1993), y testaron estas fusiones usando el reportero 17mer6x-tkCAT en varias líneas celulares (Goeman et al., 2005). Estos ensayos mostraron que ING1b posee una fuerte actividad como represor transcripcional, que se ve reducida aproximadamente al 50% como consecuencia de la eliminación de cualquiera de sus dominios (Figura 24A). Además, el dominio N-terminal es sensible al inhibidor de deacetilasas TSA, mientras que el dominio C-terminal es insensible.

En resumen, la inducción de senescencia celular por parte de ING1b correlaciona con su capacidad de reprimir la transcripción.

3.2. La unión de ING1b a H3K4 trimetilada es necesaria para la inducción de senescencia.

Recientemente se ha descrito que las proteínas ING se unen a la histona 3 trimetilada en lisina 4 (H3K4Me3), marcador de promotores activos, mediante su dominio PHD. En ING2, esta unión permite el reclutamiento de complejos con actividad HDAC a la cromatina, que reprimen la transcripción (Shi et al., 2006; Pena et al., 2006). Estos resultados, unidos a las observaciones obtenidas con los mutantes de deleción de ING1b, nos llevaron a plantear la hipótesis de que la inducción de senescencia por ING1b requiere, por un lado, la interacción con actividades modificadoras de histonas a través de su extremo N-terminal, y por otro, el reconocimiento de marcas de cromatina mediante el dominio PHD (Figura 20A).

Para probar nuestra hipótesis, nos propusimos determinar la importancia de la unión de ING1b a histonas en la inducción de senescencia. Se ha caracterizado que en el PHD de ING2, la Tirosina 215 y el Triptófano 238 forman un bolsillo aromático responsable del reconocimiento de la Lisina trimetilada, y estos aminoácidos son esenciales para la interacción de ING2 con la H3K4Me3 (Figura 25B). Dado el alto grado de conservación de secuencia entre el PHD de ING1 e ING2, decidimos generar mutantes puntuales para los

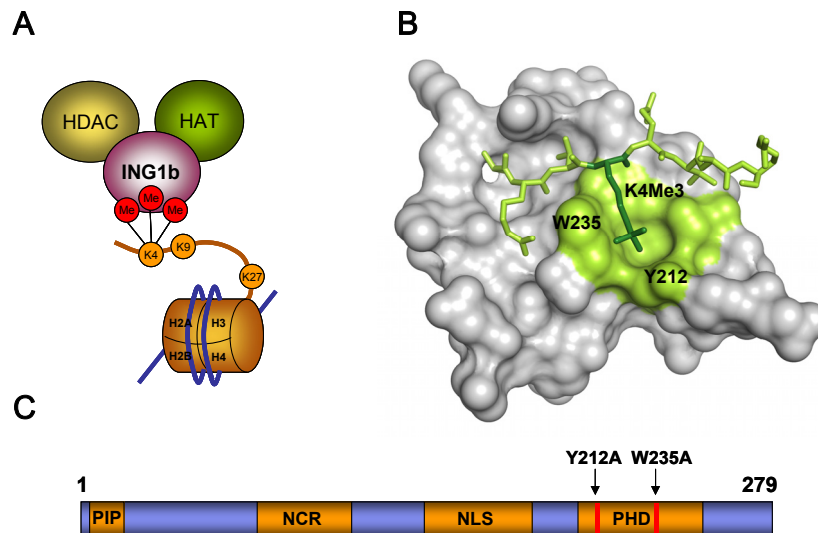


Figura 25. Interacción de ING1b con H3K4Me3. (A) Esquema del modelo de acción de ING1b a través del reconocimiento de marcas de cromatina y la asociación con actividades modificadoras de histonas. (B) Esquema que representa la interacción del dominio PHD de ING1 (gris, los aminoácidos que forman el bolsillo aromático están coloreados en verde), y un péptido de las Histona 3 trimetilada en la lisina 4 (verde, la lisina 4 trimetilada se colorea en verde oscuro). (C) Representación esquemática de ING1b donde se señalan los aminoácidos implicados en la interacción con H3K4Me3 mutados.

correspondientes de estos aminoácidos en ING1, la Tirosina 212 y el Triptófano 235, mutando estos residuos por Alanina (Figura 25C).

Lo primero que quisimos analizar fue la expresión y localización de estos mutantes, para lo cual los expresamos en células IMR90 mediante transducción retroviral, y realizamos

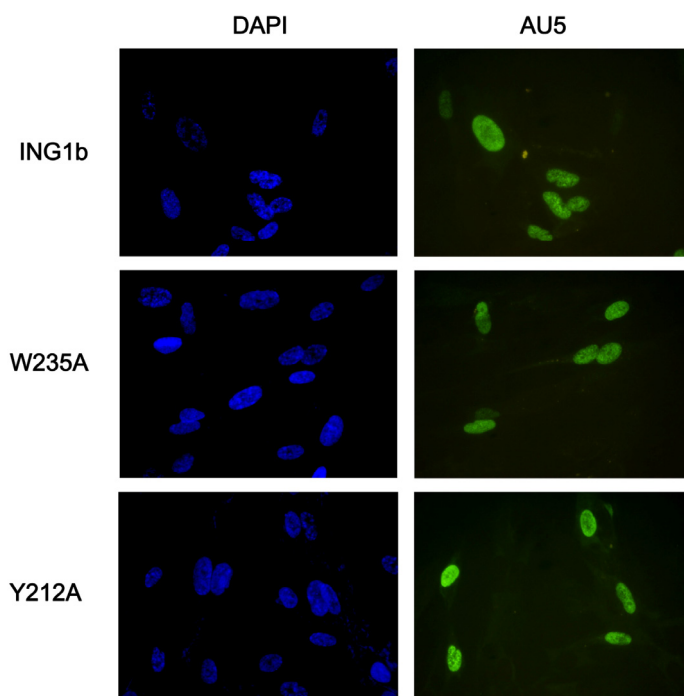


Figura 26. Los mutantes de ING1b W235A e Y212A presentan una localización normal. Las células IMR90 infectadas con ING1b o sus mutantes puntuales se sometieron a inmunofluorescencia con un anticuerpo contra el marcador AU5.

experimentos de inmunofluorescencia. Los mutantes se detectaban en núcleo, y no mostraban diferencias obvias en su patrón de localización (Figura 26).

Para determinar el posible efecto de las mutaciones en proliferación celular, realizamos curvas de crecimiento con células IMR90 infectadas retroviralmente con la forma ING1b silvestre y los mutantes de ING1b. De forma consistente con resultados anteriores, ING1b induce un marcado descenso en la

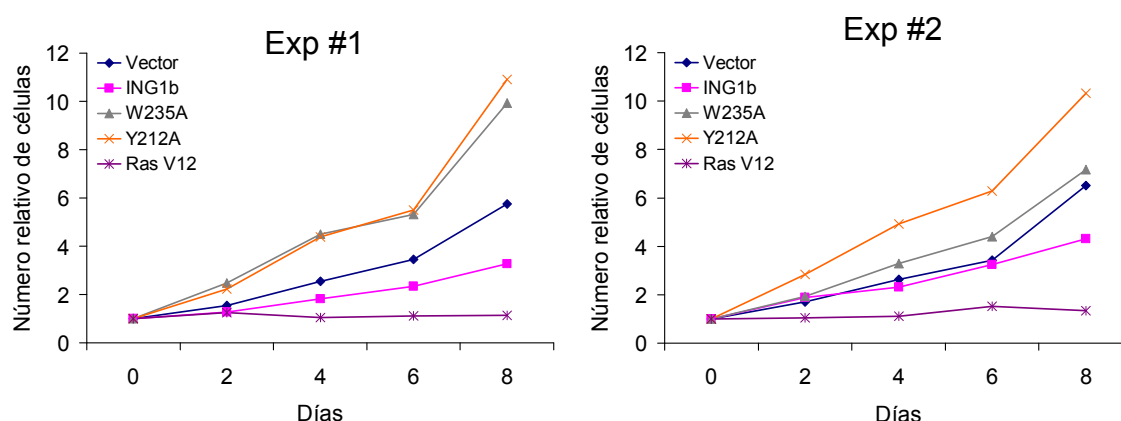


Figura 27. Los mutantes de ING1b de unión a histonas no inducen parada de ciclo celular. Curvas de crecimiento realizadas con células IMR90 infectadas con vector vacío, ING1b, o sus mutantes puntuales para la unión de H3K4Me3. Como control de parada de ciclo usamos células infectadas con Ras V12. Se representa el número de células de forma relativa a día 0. Se presentan las curvas correspondientes a dos infecciones independientes.

proliferación celular a lo largo del periodo analizado. Sin embargo, las células infectadas con los mutantes no mostraron este efecto, incluso presentaron una tasa de proliferación mayor que la de los controles con vector vacío (Figura 27). Este fenotipo se observó también en ensayos de incorporación de BrdU en estas células (Figura 28A).

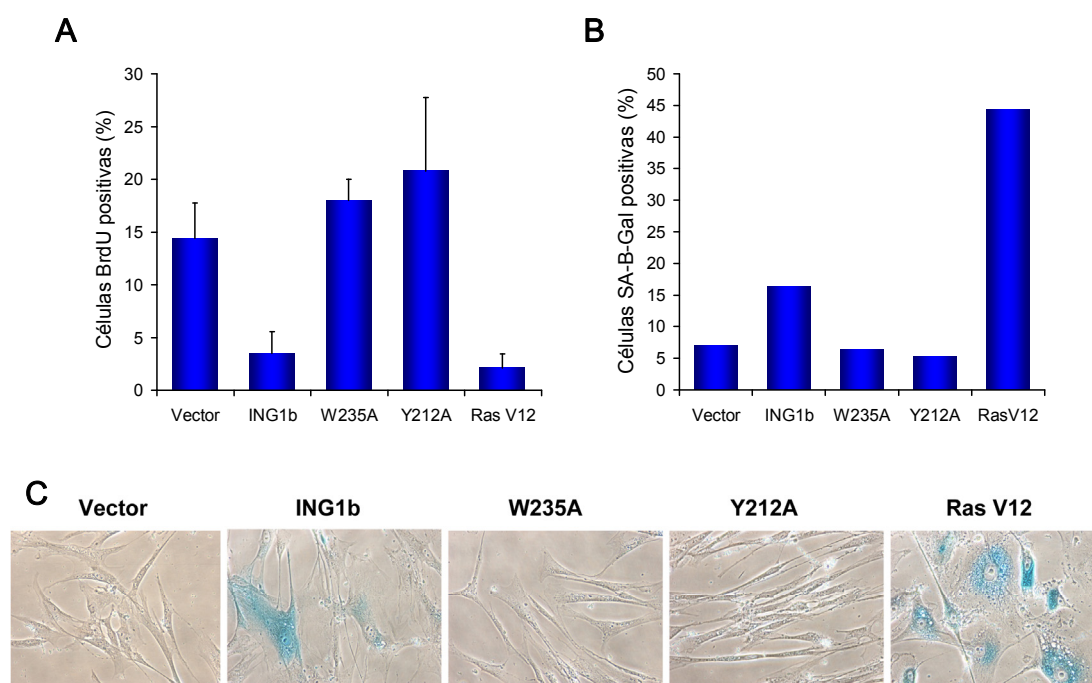


Figura 28. Los mutantes de ING1b de unión a histonas no inducen senescencia celular. Células IMR90 se infectaron retroviralmente para la expresión de ING1b, sus mutantes de unión a H3K4Me3 y Ras V12 (A) Ensayo de incorporación de BrdU de las células infectadas, a 6 días postselección. Se representa la media de tres experimentos. (B) Porcentaje de células SA-β-Gal positivas para cada infección a día 6 postselección, en un experimento representativo. (C) Imágenes de contraste de fases que muestran la morfología y la tinción Sa-β-Gal de las células infectadas con cada construcción.

Además, mientras que la expresión de ING1b induce un cambio a morfología senescente y una inducción de la actividad SA- β -Gal, ninguno de los mutantes presentó estas características de células senescentes (Figura 28 B y C).

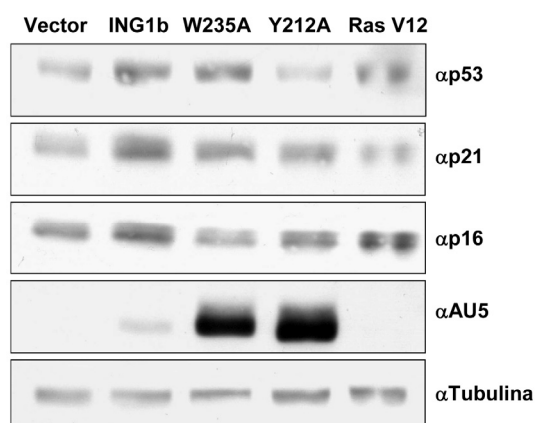


Figura 29. ING1b induce una acumulación de p53, p21 y p16 que se pierde en los mutantes de unión a histonas. Análisis por Western blot de los niveles de p53, p21, p16, e ING1b ectópico (utilizando un anticuerpo anti-AU5), en IMR90 infectadas con las construcciones indicadas, a 6 días postselección.

Para analizar otros marcadores de senescencia a nivel molecular, sometimos a estas células a análisis por *Western blot*. La sobreexpresión de ING1b induce un aumento en los niveles de p53, y de los inhibidores de CDKs p21 y p16. En cambio, la inducción de estas proteínas se ve parcialmente comprometida en las células que expresan los mutantes de ING1b (Figura 29). En el curso de estos experimentos, hemos observado consistentemente altos niveles de expresión de las formas mutantes de ING1b, aunque por el momento desconocemos la causa de estas diferencias en niveles entre la forma silvestre y los mutantes.

Este conjunto de resultados sugieren que, para la inducción de senescencia, ING1b requiere su capacidad de reconocimiento de marcas específicas de histonas.

3.3. ING1b participa en la formación de heterocromatina durante la entrada en senescencia.

La formación de heterocromatina juega un importante papel en el control de la expresión génica durante senescencia. Dado que se ha propuesto que ING1b contribuye a la formación de heterocromatina, quisimos explorar el posible papel de ING1b en este contexto.

En primer lugar, usamos el modelo de MEFs deficientes en *Ing1* para observar los cambios globales en cromatina asociados a senescencia inducida por estrés oncogénico. Para este fin, infectamos MEFs g/g y wt con Ras V12, y con estas células realizamos experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos contra histona 3 trimetilada en lisina 9 (H3K9Me3) y HP1 γ , como marcadores de heterocromatina. No detectamos cambios generales en la localización o la distribución de ninguno de los marcadores por efecto de Ras. Sin embargo, al cuantificar la intensidad de cada señal en núcleos individuales (ver Materiales y Métodos), pudimos observar que las células infectadas con Ras V12 sufrían un aumento considerable en la señal de H3K9Me3, de forma similar en los dos genotipos (Figura

30 A y B). De forma notable, mientras que las células silvestres infectadas con Ras aumentaban también sus niveles de HP1 γ , no detectamos este aumento de señal en los MEFs g/g (Figura 30C). Estos datos podrían indicar que ING1b juega un papel en el reclutamiento de HP1 γ a sitios H3K9, y posiblemente en la formación de heterocromatina en los MEFs infectados con Ras.

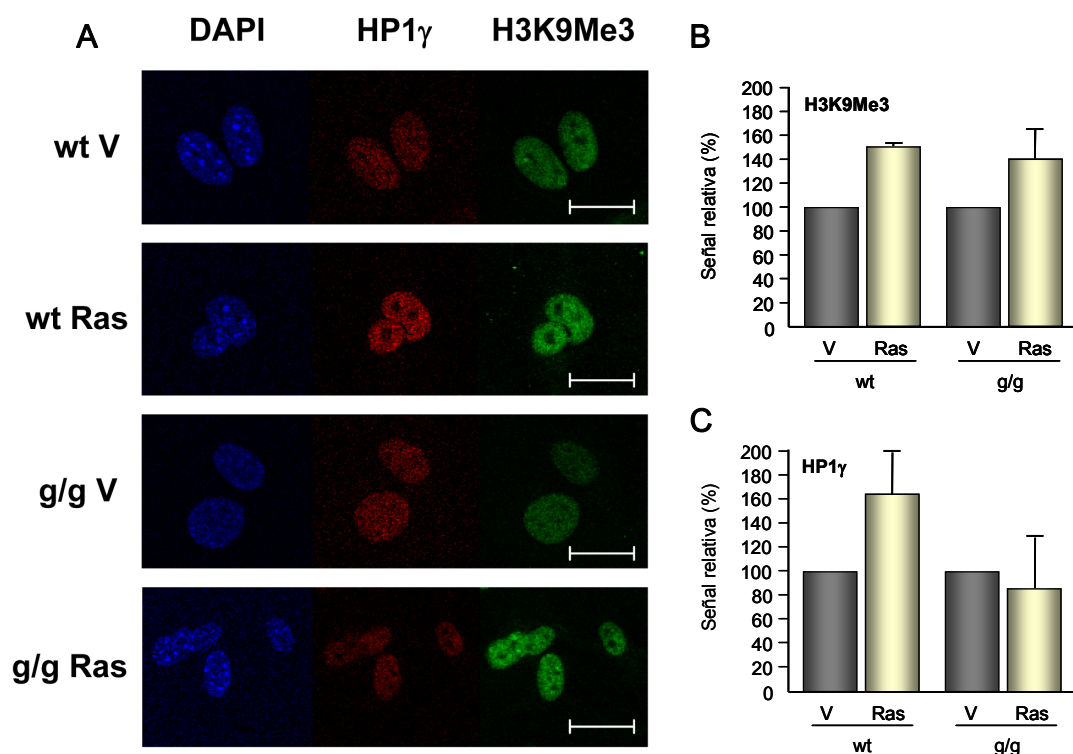


Figura 30. Cambios en cromatina en fibroblastos infectados con Ras V12. (A) Inmunofluorescencia con anticuerpos anti H3K9Me3 y anti HP1 γ en fibroblastos de ambos genotipos tras la infección con Ras V12 o un vector vacío. Se muestra la tinción con DAPI para visualizar el núcleo. Las barras de escala corresponden a 20 μ m. Se cuantificó la intensidad de la señal de H3K9Me3 (B) y HP1 γ (C) en las células infectadas. Los datos se presentan relativos al control con vector vacío, que se fijó arbitrariamente en 100%. Se representa la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

En fibroblastos humanos, durante la entrada en senescencia aparecen nuevas estructuras de heterocromatina, llamadas SAHFs, asociadas a represión transcripcional de genes relacionados con ciclo celular (Narita et al., 2003). Dadas las conexiones descritas en este trabajo entre ING1b, senescencia y cromatina, nos pareció interesante estudiar el posible papel de ING1b en la formación de SAHFs. Los SAHFs se encuentran enriquecidos en varios marcadores de heterocromatina, como la histona H3 trimetilada en lisina 9 (H3K9Me3), o la proteína HP1 γ , entre otros (Figura 31A). En este estudio, hemos utilizado estas dos proteínas y la tinción con DAPI como marcadores de SAHFs.

En primer término, analizamos la localización de ING1 endógeno con respecto a los SAHFs en células IMR90 infectadas con Ras V12. En repetidos experimentos, no hemos

observado colocalización de ING1 con los marcadores de SAHFs utilizados. De hecho, ING1 aparece generalmente excluido de heterocromatina, aunque en ocasiones se acumula en la periferia de los SAHFs (Figura 31B).

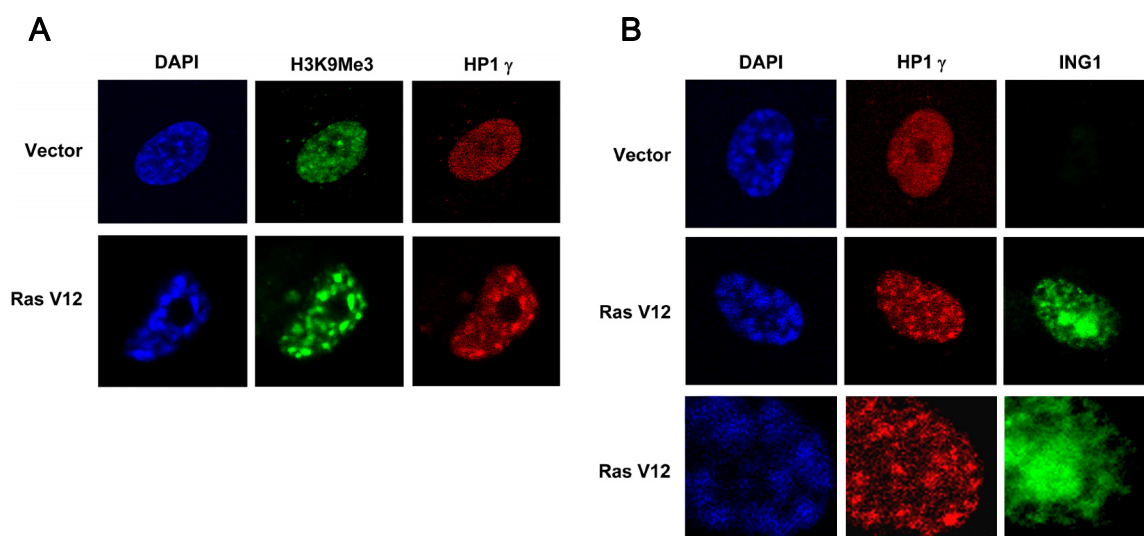


Figura 31. ING1 no colocaliza con los SAHFs inducidos por la expresión de Ras. Células IMR90 se infectaron retroviralmente con vector vacío y con un vector de expresión de Ras V12. (A) Inmunofluorescencia contra H3K9Me3 y HP1γ. (B) Inmunofluorescencia contra HP1γ e ING1, utilizando un anticuerpo contra el C-terminal de ING1b. El panel inferior corresponde a un aumento realizado sobre las imágenes de las células infectadas con Ras.

En un abordaje complementario, quisimos ver el efecto de la sobreexpresión de ING1b en la formación de SAHFs, y si la interacción con H3K4Me3 podría influir en este contexto. Para ello, infectamos IMR90 con ING1b y los mutantes descritos en el apartado 3.2., y realizamos inmunofluorescencias contra H3K9Me3 y HP1γ. Vimos que la sobreexpresión de ING1b inducía, aunque en menor grado que Ras V12, la formación de SAHFs, que se reflejaba en el aumento de zonas más densas en la tinción con DAPI, y en el patrón de H3K9Me3 y HP1γ (Figura 32). Sin embargo, los mutantes de interacción con histonas no fueron capaces de inducir SAHFs al mismo nivel que ING1b silvestre.

En resumen, hemos observado que la sobreexpresión de ING1b es capaz de inducir la formación de SAHFs. Quedaría por determinar si este resultado indica un efecto directo de ING1 en la formación de estas estructuras, o es un reflejo de la inducción de senescencia por la sobreexpresión de ING1b.

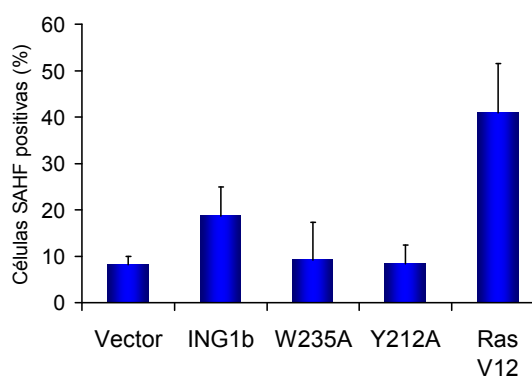


Figura 32. Inducción de SAHFs. Porcentaje de células que contienen SAHFs, en las células IMR90 infectadas con las construcciones que se indican. Se representa la media de tres infecciones independientes.

3.4. ING1b y respuesta a daño en el ADN.

Como se ha comentado en la introducción, estímulos que provocan daño en el ADN son capaces de inducir senescencia, y también se ha propuesto que la respuesta a daño en el ADN (DDR) media la entrada en senescencia tras la activación de oncogenes (Hemann and Narita, 2007). Dado que ING1b induce cambios en la estructura de la cromatina, y participa en reparación de ADN, quisimos explorar la posibilidad de que la sobreexpresión de ING1b indujera una respuesta DDR, que pudiera estar mediando la entrada en senescencia.

Con este fin, analizamos mediante inmunofluorescencia los niveles de γ -H2AX, un marcador bien caracterizado de daño en ADN, en células IMR90 infectadas con ING1b y sus mutantes puntuales. Observamos un aumento, aunque modesto, en el número de células positivas para H2AX tras la expresión de ING1b y sus mutantes (Figura 33A y B). Quisimos analizar otro marcador de la respuesta DDR, y elegimos el análisis por *Western blot* de la fosforilación de la quinasa ATM. De forma consistente con los datos de H2AX, vimos que la sobreexpresión de ING1b y los mutantes producía un pequeño aumento de la banda de ATM fosforilado, que era bastante más significativo en el caso de Ras (Figura 34).

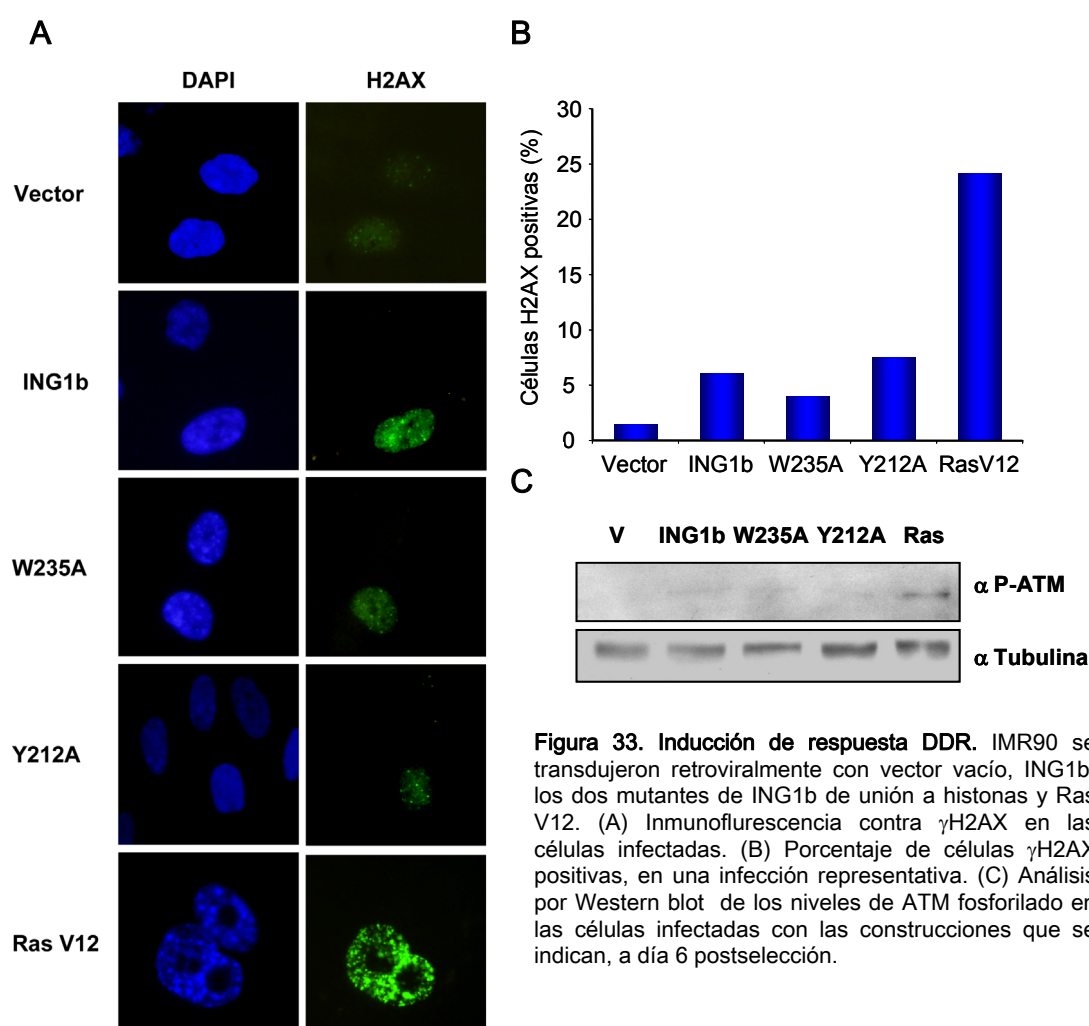
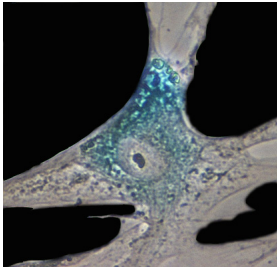


Figura 33. Inducción de respuesta DDR. IMR90 se transdujeron retroviralmente con vector vacío, ING1b, los dos mutantes de ING1b de unión a histonas y Ras V12. (A) Inmunofluorescencia contra γ H2AX en las células infectadas. (B) Porcentaje de células γ H2AX positivas, en una infección representativa. (C) Análisis por Western blot de los niveles de ATM fosforilado en las células infectadas con las construcciones que se indican, a día 6 postselección.

Por consiguiente, estos resultados sugieren que la inducción de senescencia por sobreexpresión de ING1b puede estar acompañada por una respuesta DDR (ver Discusión). Estos resultados son preliminares, y son necesarios más experimentos para dilucidar la importancia de esta respuesta en la inducción de senescencia por ING1b.

En este trabajo hemos analizado la función de ING1b en la respuesta de senescencia celular, mediante el uso de modelos de ganancia y pérdida de función, en fibroblastos primarios humanos y de ratón. Hemos mostrado que la sobreexpresión de ING1b es suficiente para desencadenar senescencia celular en fibroblastos humanos. Este efecto es dependiente de p53, y correlaciona con su capacidad de reconocimiento de marcas de cromatina y represión transcripcional. Asimismo, en estas células ING1b se regula durante la senescencia inducida por Ras V12, y es necesario para la respuesta antiproliferativa ante estrés oncogénico. Usando un modelo de ratón de pérdida de función de *Ing1*, demostramos que la falta de Ing1 produce una evasión de la entrada en senescencia inducida por Ras V12 en MEFs, que se acompaña de un defecto en la inducción de p53 y defectos en la formación de heterocromatina.

Nuestros datos sugieren que ING1b es un importante regulador de la inducción de senescencia celular, en conexión con la vía de p53 y la maquinaria de remodelación de cromatina.



Discusión

La familia de proteínas ING suscita actualmente un gran interés debido a su relación con supresión tumoral. Las evidencias bioquímicas de su conexión con la vía p53, y su participación en complejos modificadores de histonas, apoyan la visión de que las proteínas ING representan un nexo importante entre las respuestas mediadas por p53 y regulación de cromatina.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de ING1, el miembro fundador y más caracterizado de esta familia. ING1 ha sido implicado en procesos de supresión tumoral como parada de ciclo celular, reparación de daño en ADN, y apoptosis. Además, de forma consistente con su papel como supresor tumoral, se han detectado alteraciones del locus ING1 en varios tipos de tumores humanos.

La senescencia celular constituye un importante mecanismo de supresión tumoral, a través del cual células con alteraciones potencialmente oncogénicas entran en un estado estable de no proliferación. Esta respuesta está gobernada por las vías de p53 y Rb, y se encuentra regulada epigenéticamente, implicando procesos de remodelación de cromatina.

El estudio de la posible relación entre ING1 y senescencia ha generado interés desde el descubrimiento de esta proteína. De forma anterior a este trabajo, se ha propuesto que los niveles de ING1b aumentan con la acumulación de divisiones en células epiteliales y fibroblastos humanos (Schwarze et al., 2002; Garkavtsev and Riabowol, 1997). Por otro lado, la disminución de la expresión del gen *ING1* mediante la utilización de ARN antisentido conduce a una extensión de la vida en cultivo de fibroblastos primarios humanos (Garkavtsev and Riabowol, 1997).

Con estos antecedentes, nos dispusimos a caracterizar el posible papel de ING1b como modulador de la senescencia celular. Nuestros datos demuestran que ING1b es un importante regulador de la senescencia celular en fibroblastos humanos y de ratón.

En primer lugar, observamos que la sobreexpresión de ING1b en fibroblastos primarios humanos es suficiente para desencadenar una respuesta antiproliferativa, que se acompaña de la aparición de marcadores de senescencia como la actividad enzimática SA- β -Gal o el cambio a morfología senescente (Goeman et al., 2005). Esta inducción de senescencia hemos visto que es dependiente de p53. Esto es consistente con estudios anteriores que indican que ING1b necesita la presencia de p53 para realizar otras funciones como parada de ciclo, reparación de ADN, o apoptosis (Garkavtsev et al., 1998; Shinoura et al., 1999; Cheung et al., 2001; Cheung and Li, 2002; Gonzalez et al., 2006; Zhu et al., 2006). De forma posterior a nuestros resultados, se ha descrito que ING2, el miembro de la familia más relacionado con ING1, es un regulador de la entrada en senescencia replicativa en fibroblastos humanos, en conexión con p53, apoyando el papel de esta familia de proteínas

en senescencia celular (Pedeux et al., 2005). Curiosamente, se ha descrito muy recientemente que ING2 podría también actuar como regulador negativo de esta respuesta (Kumamoto et al., 2008).

Viendo que la expresión ectópica de ING1b era capaz de inducir senescencia celular, quisimos ver si estaba involucrado en la entrada en senescencia por otras situaciones, como estrés oncogénico. Hemos observado que los niveles de la proteína ING1b aumentan en las células IMR90 sometidas a estrés oncogénico, por sobreexpresión de Ras V12, o por un aumento en la actividad de MEK1. Los niveles de mensajero de ING1b no se veían aumentados significativamente. Por tanto, el aumento en la cantidad de proteína ING1b no correlaciona con los niveles de mensajero, y aunque no podemos descartar que no haya regulación a nivel transcripcional, pensamos que podría existir una estabilización a nivel postraducciona. En este contexto, se ha descrito que la estabilidad de ING1b se regula por fosforilación en la Serina 126, que modula su afinidad con la maquinaria de degradación (Garate et al., 2007; Garate et al., 2008). En condiciones de estrés genotóxico, esta fosforilación está mediada por la quinasa Chk1, y la inactivación de distintos componentes de la vía ATM/ATR impide la fosforilación y estabilización de ING1b. Dado que recientemente se ha descrito que el estrés oncogénico induce una respuesta DDR en fibroblastos humanos (Di Micco et al., 2006), podría ser que la fosforilación de ING1b sea un mecanismo común de estabilización ante distintos tipos de estrés, mediado por la ruta ATM/ATR. Sería interesante contrastar esta hipótesis, realizando experimentos para ver si ING1b cambia su estado de fosforilación tras la inducción de estrés oncogénico, y si este estado de fosforilación se ve afectado por la inactivación de la ruta ATM/ATR.

Recientemente se ha descrito que los niveles de ING1a aumentan en senescencia replicativa, y que su sobreexpresión puede inducir senescencia en fibroblastos humanos (Soliman et al., 2008). No podemos comprobar si los niveles de proteína ING1a aumentan con estrés oncogénico por *Western blot*, debido a que no hemos podido detectar una banda específica de ING1a con nuestro anticuerpo. Hemos analizado los niveles de mensajero de ING1a por RT-PCR y PCR cuantitativa, y hemos observado que los niveles basales son difícilmente detectables, y no aumentan con Ras.

Para analizar la importancia de ING1b endógeno en senescencia inducida por estrés oncogénico, hemos utilizado interferencia de ARN, usando un vector que expresa microARNs específicos contra la isoforma ING1b. Hemos demostrado que la interferencia de ING1b produce la evasión de parada de ciclo celular tras estrés oncogénico. Por consiguiente, parece que ING1b es necesario para la respuesta a estrés oncogénico en fibroblastos humanos.

En este trabajo hemos utilizado otro modelo experimental, basado en fibroblastos embrionarios de ratón donde el locus *Ing1* ha sido interrumpido por la inserción de un casete gene-trap. Estas células presentan una disminución dramática de los niveles proteicos de ING1b, representando un buen modelo para el estudio de la pérdida de función de *Ing1*. Nuestros resultados demuestran que ING1 es esencial para la respuesta antiproliferativa producida por estrés oncogénico en este modelo. Los MEFs deficientes en *Ing1* responden de forma deficiente a Ras V12, evadiendo la entrada en senescencia. Así, a diferencia de los MEFs salvajes, los MEFs g/g infectados con Ras V12 mantienen un nivel de incorporación de BrdU y una tasa de proliferación normal, y no muestran actividad SA- β -Gal ni morfología senescente. Sin embargo, estas células no son totalmente insensibles a estrés oncogénico, como lo indica la ausencia de fenotipo transformado tras la infección con Ras V12. Aunque la evasión de senescencia por estrés oncogénico implica normalmente la transformación neoplásica en fibroblastos de ratón, existen evidencias previas de desacoplamiento entre estos dos fenómenos, de forma análoga a nuestros resultados (Peeper et al., 2001).

Intentando hallar las bases moleculares de este comportamiento, analizamos por *Western blot* dianas típicas de esta respuesta, y encontramos que los MEFs g/g no acumulan p53 tras la expresión de Ras V12. Sin embargo, los niveles de p19ARF aumentaban en el mismo grado que los MEFs salvajes. Por tanto, la maquinaria que une estrés oncogénico con la activación de p19ARF no está alterada. Los niveles de p21 y p16 tras la expresión de Ras V12 también eran similares en los dos genotipos. El aumento de p21, de forma independiente a la parada de ciclo celular, probablemente refleje un efecto de la sobreexpresión de Ras sobre los niveles de p21 de forma independiente de p53, y es consistente con resultados previos que sugieren que p21 es dispensable para la inducción de senescencia inducida por estrés oncogénico (Pantoja and Serrano, 1999; Groth et al., 2000).

Datos de nuestro laboratorio demuestran que la deficiencia de *Ing1* supone un defecto en la estabilidad de p53 en condiciones de no-estrés (Abad et al., 2007), por lo que puede que *Ing1* juegue un papel en la estabilización de p53, compitiendo con mdm2 por la unión de p53, como ya ha sido propuesto anteriormente (Leung et al., 2002), o mediante un efecto indirecto. ING1b se ha conectado con acetilación de p53, una modificación postraducciona asociada estabilización de la proteína durante senescencia (Pearson et al., 2000; Nagashima et al., 2001). No hemos sido capaces de detectar acetilación de p53 con Ras en MEFs de ninguno de los dos genotipos, por tanto no podemos concluir que no haya diferencias en acetilación en este contexto.

El efecto de la deficiencia de *Ing1* parece ser específico de la senescencia asociada a activación de oncogenes, ya que en nuestras manos, otras respuestas mediadas por p53 no están afectadas. Así, los MEFs *Ing1*-nulos entran en senescencia replicativa y se immortalizan

de forma similar a los MEFs de genotipo silvestre. Además, la respuesta a agentes genotóxicos no se ve afectada en los MEFs y timocitos deficientes en *Ing1* (Abad et al., 2007 y datos no mostrados). Estos datos son consistentes con los obtenidos en otro modelo de deficiencia de *Ing1* en ratón (Kichina et al., 2006). En el transcurso de este trabajo, el grupo de Stephen Jones ha publicado otro modelo de ratones *Ing1*-nulos, también mediante la tecnología de trampa génica (Coles et al., 2007), en los que proponen que la respuesta a Ras oncogénico no se ve alterada en los fibroblastos procedentes de estos ratones. Para interpretar esta discrepancia, es importante destacar que existen diferencias entre los dos modelos con respecto a la expresión de los productos del locus *Ing1*. En nuestro modelo no existe expresión del transcrito Ing1c, y muy poca expresión de los transcritos Ing1a e Ing1b. Sin embargo, en el modelo de Jones y colaboradores no hay expresión de Ing1b, mientras que la expresión de la proteína ING1c (ver Introducción) es incluso mayor de lo normal por un efecto del casete gene-trap utilizado en este modelo (Coles et al., 2007). Aunque también hay que considerar otros factores experimentales, pensamos que las diferencias descritas pueden ser reflejo de diferentes funciones de los productos del locus *Ing1* en respuesta a estrés oncogénico.

En este trabajo también hemos aportado datos que ayudan a entender la relación de ING1b con represión transcripcional y remodelación de cromatina, en el contexto de senescencia celular. En primer lugar, hemos analizado la capacidad que tienen distintos dominios de la proteína en inducción de senescencia. Utilizando una batería de mutantes de delección, el grupo de Aria Baniahmad ha identificado dos dominios en ING1b con función represora. El dominio N-terminal se asocia a actividad HDAC, mientras que el dominio C-terminal es HDAC-independiente, por lo que ING1b podría inducir represión a través de mecanismos HDAC- dependientes e independientes (Goeman et al., 2005). Nosotros quisimos determinar la capacidad de estos dominios en parada de ciclo e inducción de senescencia celular. Observamos que cada dominio por separado mostraba menor capacidad que la proteína completa de inducir parada de ciclo y marcadores de senescencia. Por tanto, existe una correlación entre represión transcripcional y capacidad de inducción de senescencia celular. La proteína completa es más eficiente induciendo represión transcripcional, parada de ciclo y senescencia que sus dominios por separado, lo que sugiere que existe cierto grado de cooperación entre ellos.

Recientemente se ha descrito que las proteínas ING, mediante su dominio PHD, son capaces de unirse a H3K4Me3, marcador de promotores activos. En el caso de ING2, esta unión permite que complejos modificadores de histonas sean reclutados a cromatina, induciendo represión transcripcional (Shi et al., 2006; Pena et al., 2006). Uniendo estas

observaciones a los datos obtenidos con los mutantes de delección, propusimos la hipótesis de que ING1b, a través de su N-terminal, se acompleja con actividades modificadoras de cromatina, y mediante el PHD, en su C-terminal, se une a la H3K4Me3. La formación de estos complejos permitiría la represión de genes necesaria para la inducción de senescencia celular.

Para validar esta hipótesis, nos propusimos determinar la importancia de la unión de ING1b a marcas específicas de cromatina. Dada la alta conservación de secuencia entre el PHD de ING1 e ING2, generamos mutantes puntuales de ING1, mutando los aminoácidos que en ING2 son esenciales para la unión de la H3K4Me3. Con estos mutantes, hemos comprobado que la interacción con histonas es necesaria para la inducción de senescencia por ING1b. Así, la expresión ectópica de estos mutantes no induce parada de ciclo celular, en contraste con la forma ING1b silvestre, medido a través de curvas de crecimiento, y análisis de incorporación de BrdU. Los mutantes tampoco inducen marcadores de senescencia, como la actividad SA- β -Gal, o cambio a morfología senescente.

Cuando analizamos por *Western blot* la expresión de proteínas reguladoras de senescencia, observamos que la forma silvestre de ING1b induce un aumento en los niveles de p53. Este dato apoya la conexión de ING1b con p53, de forma consistente con la pérdida de inducción de p53 con Ras oncogénico en los MEFs *Ing1* deficientes, o a la evasión de senescencia por ING1b cuando se expresa la oncoproteína viral E6. La expresión ectópica de ING1b también produce la inducción de los inhibidores de CDKs p21 y p16, marcadores moleculares de inducción de senescencia. Sin embargo, la sobreexpresión de los mutantes de unión a histonas no induce en el mismo grado los niveles de p53, p21 y p16. Ya que los mutantes tienen comprometida la unión con histonas, e ING1b induce represión transcripcional, los efectos que vemos en los mutantes podrían ser debidos a un defecto en represión transcripcional. Así, una posible explicación es que la inducción de p53 en IMR90 podría ser el resultado de que ING1b reprime la transcripción de un inhibidor de p53, como por ejemplo SIRT1, o MDM2. Serían necesarios experimentos de inmunoprecipitación de cromatina para ver un efecto directo de ING1b sobre los promotores de estos inhibidores.

Durante estos experimentos pudimos comprobar que los mutantes de unión a histonas, tras la infección retroviral, presentaban unos niveles de expresión mayores que la forma silvestre de ING1b. Aunque aún no hemos realizado experimentos para explicar este fenómeno, una posible explicación sería un efecto en la estabilidad de la proteína. Como hemos comentado anteriormente, se ha propuesto que la fosforilación en la Serina 126 aumenta la estabilidad de ING1b. La fosforilación en este residuo se debe, al menos, a la acción de dos quinasas (Cdk1 y Chk1) que actúan en dos contextos celulares distintos. En

condiciones normales, la quinasa Cdk1 es la responsable de esta modificación (Garate et al., 2007). Se ha descrito que el locus de la ciclina B1 (*CCNB1*), se reprime transcripcionalmente por ING1b (Takahashi et al., 2002), y se ha propuesto la existencia de un ciclo regulador entre el complejo Cdk1/ciclina B1 e ING1b. Este complejo induciría la fosforilación de ING1b, promoviendo su acumulación. Esto a su vez contribuye a la represión de *CCNB1*, y por tanto a la bajada de niveles de Cdk1/ciclina B1 (Garate et al., 2007). Una posibilidad es que los mutantes de ING1b tengan comprometida la unión y posterior represión del gen *CCNB1*. En este caso, habría un aumento en los niveles de complejo Cdk1/ciclina B1, que fosforilan ING1b aumentando su estabilidad y acumulación. Aunque seguramente existan otros factores que contribuyan a la estabilidad de ING1b a lo largo del ciclo, esta conexión podría explicar, al menos parcialmente, el aumento en la tasa de proliferación que presentan estos mutantes. Creemos que sería interesante el análisis de la expresión de ciclina B1 tras la sobreexpresión de las formas mutantes de ING1b, así como comprobar su estado de fosforilación.

Hacia el final de este trabajo, ha sido publicado un estudio sobre la interacción de ING1b con H3K4Me3, en el que se describe la necesidad de los residuos W235 y Y212 (los mismos que hemos analizado en nuestro trabajo) para la interacción. Además, demuestran que la asociación de ING1b con la H3K4Me3 es necesaria para inducción de apoptosis y reparación de ADN en células de melanoma y células HT1080. Por otro lado, describen la existencia de mutaciones en ING1b asociadas a tumores humanos, que pierden la capacidad de unir H3K4Me3. Estas mutaciones también tienen afectada la capacidad de reparación de ADN e inducción de apoptosis (Pena et al., 2008).

Estos datos son consistentes con nuestras observaciones con los mutantes puntuales de ING1b en el contexto de senescencia celular, y apoyan la idea de que ING1b, para realizar sus funciones biológicas, necesita de la interacción con marcas de cromatina, uniendo su capacidad de supresión tumoral con regulación epigenética.

Nuestras observaciones en MEFs y fibroblastos humanos acerca de la necesidad de ING1b para la entrada en senescencia por estrés oncogénico, una respuesta donde tienen lugar cambios en la estructura de la cromatina, nos llevaron a estudiar la posible contribución de ING1b en formación de heterocromatina en este contexto.

Hemos observado que la expresión de Ras V12 en MEFs de genotipo silvestre induce un aumento en dos marcadores de heterocromatina, H3K9Me3 y HP1 γ . Esto supone que, aunque en fibroblastos primarios de ratón no se ha descrito la aparición de estructuras de heterocromatina definidas equivalentes a los SAHFs, el estrés oncogénico produce cambios en la estructura de la cromatina, de forma similar a lo que sucede en células humanas (Narita et al., 2003). Los MEFs deficientes en *Ing1*, tras la expresión de Ras V12, no aumentan la

intensidad de la señal de HP1 γ , lo que puede explicarse por un posible papel de ING1b en el reclutamiento de HP1 γ a sitios H3K9Me3. El reclutamiento de HP1 γ a sitios H3K9Me3 se considera un paso importante dentro de la formación y el mantenimiento de heterocromatina (Maison and Almouzni, 2004). Por consiguiente, pensamos que el desacoplamiento en las señales de H3K9Me3 y HP1 γ que observamos en los MEFs *Ing1*-nulos podría traducirse en un defecto en heterocromatización, que se acompaña de un defecto en la respuesta antiproliferativa de estas células tras la expresión de Ras oncogénico.

Aunque es posible que las diferencias en cromatina observadas reflejen un efecto indirecto de la deficiencia de *Ing1* en la implementación de senescencia, las numerosas evidencias que unen a ING1 con regulación de cromatina, apoyan la idea de que ING1b regula formación de heterocromatina en respuesta a estrés oncogénico. Por un lado, se ha propuesto que ING1b puede jugar un papel en la deposición de HP1 durante la formación de nueva heterocromatina (Xin et al., 2004). Por otro, numerosos trabajos describen que ING1b modula acetilación de histonas (Vieyra et al., 2002; Xin et al., 2004; Doyon et al., 2006). Y existen evidencias que ponen de manifiesto que la desacetilación de histonas es necesaria para el anclaje de HP1 γ a la cromatina (Maison et al., 2002; David et al., 2003; Mateescu et al., 2004; Dannenberg et al., 2005). Aunque directamente no hemos mirado el estado de acetilación de histonas en nuestras células, pensamos que es posible que la falta de ING1b impida el reclutamiento de HP1 γ y la formación de heterocromatina durante la respuesta a Ras oncogénico, como consecuencia de su papel en acetilación de histonas.

A falta de un mecanismo preciso, nuestros resultados con células deficientes en *Ing1* muestran una clara correlación entre regulación de cromatina y respuesta antiproliferativa a Ras V12, y ponen de manifiesto la importancia de la formación de heterocromatina durante la respuesta a estrés oncogénico en células de ratón, de forma análoga al fenómeno observado en fibroblastos humanos. De acuerdo con esta idea, se ha descrito que los animales genéticamente nulos para la histona metil-transferasa Suv39h1 muestran una deficiencia en la entrada en senescencia inducida por Ras V12 (Braig et al., 2005), y por otro lado recientemente se ha propuesto que la deficiencia en la demetilasa Jhdm1b/Kdm2b induce senescencia en fibroblastos primarios de ratón (He et al., 2008).

Los cambios en heterocromatina asociados a senescencia están mejor caracterizados en células humanas. La formación de SAHFs se describió en fibroblastos humanos, como estructuras de heterocromatina que producen la represión de genes implicados en la progresión de ciclo celular. Dado el papel de ING1b en regulación y formación de heterocromatina, y su participación en la inducción de senescencia celular, nos pareció interesante estudiar si ING1b estaba relacionado con la formación de SAHFs en fibroblastos

humanos. Hemos comprobado que la sobreexpresión de ING1b en células IMR90 induce la formación de SAHFs, aunque en menor grado que Ras V12. Esta inducción se pierde cuando expresamos las formas mutantes de ING1b que no unen H3K4Me3, de modo que la inducción de SAHFs por parte de ING1b necesita de su interacción con marcas de cromatina.

Mediante experimentos de inmunofluorescencia hemos observado que ING1, al menos en las condiciones de nuestros experimentos, no parece ser un componente estructural de los SAHFs. No hemos detectado colocalización de ING1 con los marcadores de heterocromatina H3K9Me3 y HP1 γ , ni con zonas hipercromáticas teñidas con DAPI, en condiciones de sobreexpresión de Ras V12, ni cuando inducimos SAHFs mediante la expresión ectópica de ING1b. Sin embargo, ING1b frecuentemente aparece concentrado en la periferia de los SAHFs, sugiriendo una posible relación funcional entre ambos. Teniendo en cuenta la capacidad dual de ING1b de reconocer marcas de cromatina activa, e inducir represión transcripcional y formación de heterocromatina, es posible que ING1b estuviera definiendo el límite entre zonas de cromatina activa e inactiva durante senescencia.

Con la información que disponemos por el momento, no podemos saber si la inducción de SAHFs que observamos se debe a un efecto directo de ING1b en la formación de heterocromatina, o es un reflejo de la entrada en senescencia inducida por la sobreexpresión de ING1b. El análisis de la formación de SAHFs por Ras V12 en condiciones de deficiencia de ING1b pensamos que no será muy informativo, ya que según nuestros resultados, la interferencia de ING1b en IMR90 produce una pérdida de la respuesta antiproliferativa a estrés oncogénico, que seguramente se acompañe de una pérdida en la formación de SAHFs. Consideramos que sería interesante generar vectores lentivirales para la interferencia de ING1b en células senescentes, que nos aportarán información sobre el posible papel de ING1b en el mantenimiento de la estructura de cromatina, y en general en el mantenimiento del fenotipo senescente.

Dentro de nuestro trabajo para entender los mecanismos a través de los cuales ING1b induce senescencia celular, quisimos determinar si la respuesta de daño en ADN (DDR) estaba participando en este proceso. Comprobamos que ING1b induce, en cierto grado, dos marcadores de esta respuesta como γ -H2AX y ATM fosforilada, aunque esta inducción es modesta, y en todo caso mucho menor que la producida por Ras V12. Es interesante destacar que los mutantes para la unión de H3K4 de ING1b producen un efecto similar que la proteína silvestre. Estos resultados pueden significar que la inducción de DDR que vemos no es significativa o, que en todo caso, no está mediando la inducción de senescencia por ING1b, que hemos demostrado que depende de unión a cromatina. Apoyando esta visión, en nuestros experimentos no hemos observado que la sobreexpresión de ING1b produzca una

fase de hiperproliferación, como está caracterizado para Ras, causante de daño en el ADN (Di Micco et al., 2006), y tampoco existen evidencias de que ING1b induzca un aumento en los niveles de ROS, como agente genotóxico, e inductor de la respuesta DDR.

Estos experimentos son preliminares, y sería interesante caracterizar mejor la existencia o no de daño en ADN por la sobreexpresión de ING1b. Además, estamos interesados en ver la importancia de la respuesta a DDR en la inducción de senescencia por ING1b. La inactivación por ARN de interferencia de distintos componentes de la vía ATM/ATR nos ayudarán a dar luz a esta cuestión.

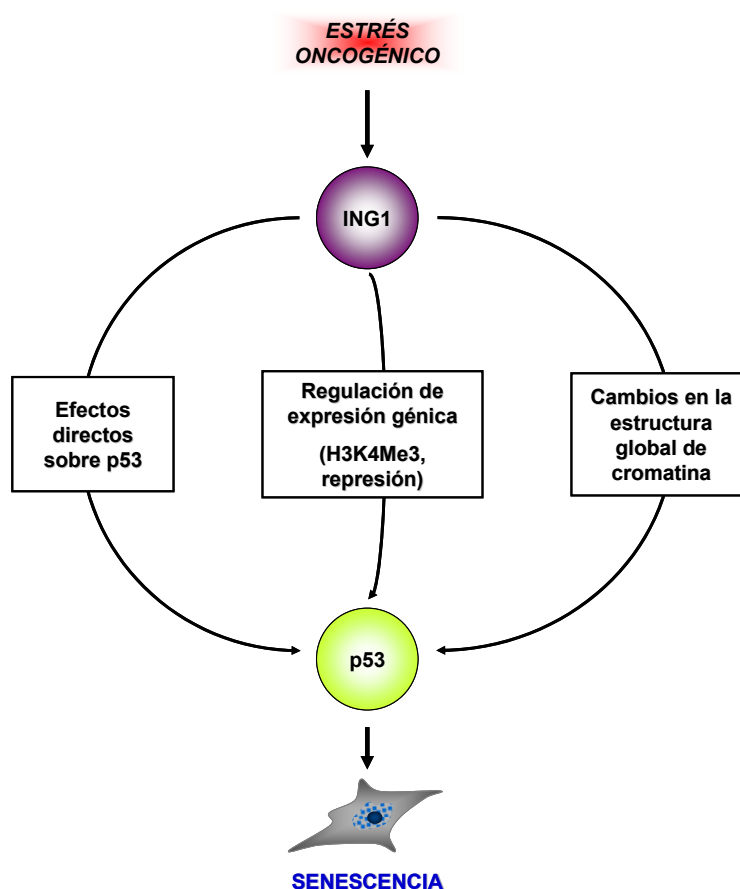
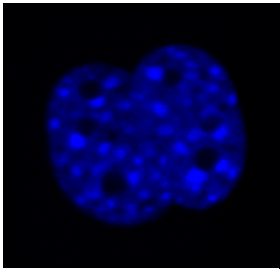


Figura 34. Mecanismos de acción de ING1 en senescencia celular.

Como resumen, el trabajo descrito en esta tesis aporta nuevos datos sobre la función de la proteína ING1b en senescencia, una respuesta celular asociada a supresión tumoral. Mediante el uso de modelos de ganancia y pérdida de función de ING1b, hemos demostrado que esta proteína induce senescencia celular en fibroblastos humanos, de forma dependiente de p53 y a través de la interacción con marcas específicas de cromatina. Además, mostramos que ING1b es un importante regulador de la senescencia inducida por estrés oncogénico, en

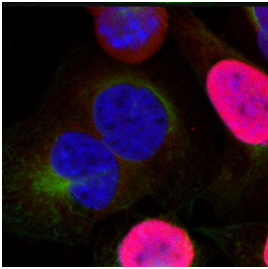
células humanas y en fibroblastos embrionarios de ratón. En conjunto, estos resultados apoyan que ING1b tiene un papel dual en la inducción de senescencia, por un lado, como regulador de p53, y por otro, mediando procesos de remodelación de cromatina.

Desde un punto de vista más general, nuestras observaciones pueden ayudar a interpretar el significado de las alteraciones de ING1b halladas en tumores humanos. La mayoría de estas alteraciones consisten en una reducción de los niveles de ARN o proteína de ING1b (Nouman et al., 2003b), en una situación similar a la de nuestros modelos de pérdida de función. Como nosotros describimos, esto podría significar que las células con la función de ING1b alterada poseen una ventaja en proliferación ante estímulos oncogénicos, ya que desarrollan una activación deficiente de las respuestas celulares como la senescencia celular. Esto produciría un debilitamiento de las barreras de protección antitumoral, y permitiría que células con alteraciones potencialmente oncogénicas prosigan en su camino hacia la formación de un tumor.



Conclusiones

1. La sobreexpresión de ING1b en fibroblastos primarios humanos induce una parada de ciclo celular, que se acompaña de la aparición de marcadores de senescencia. La inducción de esta respuesta es dependiente de p53.
2. Los niveles de proteína ING1b endógena aumentan durante la senescencia inducida por estrés oncogénico en fibroblastos primarios humanos. Experimentos de interferencia de ARN demuestran que ING1b es necesario para la respuesta antiproliferativa a estrés oncogénico en estas células.
3. Los fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en *Ing1* no son capaces de inducir senescencia en respuesta a la expresión del oncogén Ras V12. Este fenotipo se acompaña de defectos en la acumulación de p53 y en la formación de heterocromatina. La insensibilidad de estas células a estrés oncogénico no es completa, ya que no supone su transformación neoplásica.
4. La capacidad de ING1b de inducir senescencia celular en fibroblastos humanos correlaciona con su capacidad de represión transcripcional y requiere el reconocimiento de marcas específicas de histonas.
5. En fibroblastos humanos, la sobreexpresión de ING1b induce la aparición de SAHFs, estructuras de heterocromatina asociadas a represión transcripcional durante senescencia celular. Este efecto requiere la capacidad de ING1b de reconocer marcas de cromatina específicas. ING1 no es un componente estructural de los SAHFs, y se encuentra excluido de los focos de heterocromatina, observándose su acumulación en la periferia de estas estructuras.
6. La expresión ectópica de ING1b provoca una inducción débil de marcadores de respuesta de daño en ADN. Sin embargo, este efecto no correlaciona con su capacidad de unión a marcas de histonas, o inducción de senescencia.



Bibliografía

- Abad, M., Menendez, C., Fuchtbauer, A., Serrano, M., Fuchtbauer, E.M., and Palmero, I. (2007). Ing1 mediates p53 accumulation and chromatin modification in response to oncogenic stress. *J Biol Chem* 282, 31060-31067.
- Baker, L.A., Allis, C.D., and Wang, G.G. (2008). PHD fingers in human diseases: Disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. *Mutat Res*.
- Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8832-8836.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22, 4212-4222.
- Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., et al. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428, 431-437.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6, 611-622.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.

Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.

Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3, 339-349.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740.

Coles, A.H., Liang, H., Zhu, Z., Marfella, C.G., Kang, J., Imbalzano, A.N., and Jones, S.N. (2007). Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 2054-2061.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

Collado, M., and Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6, 472-476.

Courtois-Cox, S., Genther Williams, S.M., Reczek, E.E., Johnson, B.W., McGillicuddy, L.T., Johannessen, C.M., Hollstein, P.E., MacCollin, M., and Cichowski, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 10, 459-472.

Courtois-Cox, S., Jones, S.L., and Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27, 2801-2809.

Chan, S.W., Chang, J., Prescott, J., and Blackburn, E.H. (2001). Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol* 11, 1240-1250.

Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., and Ames, B.N. (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 332 (Pt 1), 43-50.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.

Cheung, K.J., Jr., Bush, J.A., Jia, W., and Li, G. (2000). Expression of the novel tumour suppressor p33(ING1) is independent of p53. *Br J Cancer* 83, 1468-1472.

Cheung, K.J., Jr., and Li, G. (2002). p33(ING1) enhances UVB-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res* 279, 291-298.

- Cheung, K.J., Jr., Mitchell, D., Lin, P., and Li, G. (2001). The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res* 61, 4974-4977.
- Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B., and Evan, G.I. (2006). The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 443, 214-217.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 21, 379-384.
- Dannenberger, J.H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W.H., and Depinho, R.A. (2005). mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev* 19, 1581-1595.
- David, G., Turner, G.M., Yao, Y., Protopopov, A., and DePinho, R.A. (2003). mSin3-associated protein, mSds3, is essential for pericentric heterochromatin formation and chromosome segregation in mammalian cells. *Genes Dev* 17, 2396-2405.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, 2100-2110.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8, 2540-2551.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dirac, A.M., and Bernards, R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem* 278, 11731-11734.
- Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A.J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., Yang, X.J., and Cote, J. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 21, 51-64.

- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 24, 1884-1896.
- Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., and Serrano, M. (2006). Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 443, 159.
- Feng, X., Hara, Y., and Riabowol, K. (2002). Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 12, 532-538.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000). Cell cycle regulation in H(2)O(2)-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol* 35, 733-745.
- Funayama, R., and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* 116, 431-440.
- Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H., and Ishikawa, F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175, 869-880.
- Garate, M., Campos, E.I., Bush, J.A., Xiao, H., and Li, G. (2007). Phosphorylation of the tumor suppressor p33(ING1b) at Ser-126 influences its protein stability and proliferation of melanoma cells. *FASEB J* 21, 3705-3716.
- Garate, M., Wong, R.P., Campos, E.I., Wang, Y., and Li, G. (2008). NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 inhibits the proteasomal degradation of the tumour suppressor p33(ING1b). *EMBO Rep* 9, 576-581.
- Garkavtsev, I., Grigorian, I.A., Ossovskaya, V.S., Chernov, M.V., Chumakov, P.M., and Gudkov, A.V. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 391, 295-298.
- Garkavtsev, I., Kazarov, A., Gudkov, A., and Riabowol, K. (1996). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 14, 415-420.
- Garkavtsev, I., and Riabowol, K. (1997). Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17, 2014-2019.
- Gil, J., Bernard, D., Martinez, D., and Beach, D. (2004). Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol* 6, 67-72.
- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 667-677.

- Goeman, F., Thormeyer, D., Abad, M., Serrano, M., Schmidt, O., Palmero, I., and Baniahmad, A. (2005). Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* 25, 422-431.
- Gong, W., Russell, M., Suzuki, K., and Riabowol, K. (2006). Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol* 26, 2947-2954.
- Gonzalez, L., Freije, J.M., Cal, S., Lopez-Otin, C., Serrano, M., and Palmero, I. (2006). A functional link between the tumour suppressors ARF and p33ING1. *Oncogene*.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907-913.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., et al. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.
- Groth, A., Weber, J.D., Willumsen, B.M., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (2000). Oncogenic ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D- dependent kinases. *J Biol Chem* 275, 27473-27480.
- Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 331-341.
- Halbert, C.L., Demers, G.W., and Galloway, D.A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 65, 473-478.
- Han, X., Feng, X., Rattner, J.B., Smith, H., Bose, P., Suzuki, K., Soliman, M.A., Scott, M.S., Burke, B.E., and Riabowol, K. (2008). Tethering by lamin A stabilizes and targets the ING1 tumour suppressor. *Nat Cell Biol*.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- He, J., Kallin, E.M., Tsukada, Y.I., and Zhang, Y. (2008). The H3K36 demethylase Jhdml1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol*.

Hemann, M.T., and Narita, M. (2007). Oncogenes and senescence: breaking down in the fast lane. *Genes Dev* 21, 1-5.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14, 501-513.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.

Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164-168.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse *INK4a* locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.

Kataoka, H., Bonnefin, P., Viegas, D., Feng, X., Hara, Y., Miura, Y., Joh, T., Nakabayashi, H., Vaziri, H., Harris, C.C., et al. (2003). *ING1* represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* 63, 5785-5792.

Khan, S., Guevara, C., Fujii, G., and Parry, D. (2004). p14ARF is a component of the p53 response following ionizing irradiation of normal human fibroblasts. *Oncogene* 23, 6040-6046.

Khan, S.H., Moritsugu, J., and Wahl, G.M. (2000). Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3266-3271.

Kichina, J.V., Zeremski, M., Aris, L., Gurova, K.V., Walker, E., Franks, R., Nikitin, A.Y., Kiyokawa, H., and Gudkov, A.V. (2006). Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 25, 857-866.

Krimpenfort, P., Quon, K.C., Mooi, W.J., Loonstra, A., and Berns, A. (2001). Loss of p16^{Ink4a} confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83-86.

Kumamoto, K., Spillare, E.A., Fujita, K., Horikawa, I., Yamashita, T., Appella, E., Nagashima, M., Takenoshita, S., Yokota, J., and Harris, C.C. (2008). *Nutlin-3a* activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate *mir-34a*, *mir-34b*, and *mir-34c* expression, and induce senescence. *Cancer Res* 68, 3193-3203.

- Kuo, W.H., Wang, Y., Wong, R.P., Campos, E.I., and Li, G. (2007). The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Exp Cell Res* 313, 1628-1638.
- Kuo, W.L., Abe, M., Rhee, J., Eves, E.M., McCarthy, S.A., Yan, M., Templeton, D.J., McMahon, M., and Rosner, M.R. (1996). Raf, but not MEK or ERK, is sufficient for differentiation of hippocampal neuronal cells. *Mol Cell Biol* 16, 1458-1470.
- Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 22, 835-848.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274, 7936-7940.
- Leung, K.M., Po, L.S., Tsang, F.C., Siu, W.Y., Lau, A., Ho, H.T., and Poon, R.Y. (2002). The Candidate Tumor Suppressor ING1b Can Stabilize p53 by Disrupting the Regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res* 62, 4890-4893.
- Lin, A.W., and Lowe, S.W. (2001). Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5025-5030.
- Loewith, R., Meijer, M., Lees-Miller, S.P., Riabowol, K., and Young, D. (2000). Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 20, 3807-3816.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 296-304.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H., Quivy, J.P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30, 329-334.
- Mariadason, J.M. (2008). HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* 3, 28-37.
- Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2004). Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep* 5, 490-496.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.

Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.

Munro, J., Barr, N.I., Ireland, H., Morrison, V., and Parkinson, E.K. (2004). Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res* 295, 525-538.

Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S.P., Pedoux, R., Wang, X.W., Yokota, J., Riabowol, K., and Harris, C.C. (2001). DNA damage-inducible gene p33^{ING2} negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9671-9676.

Narita, M. (2007). Cellular senescence and chromatin organisation. *Br J Cancer* 96, 686-691.

Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., and Lowe, S.W. (2006). A novel role for high-mobility group proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503-514.

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.

Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70, 5701-5705.

Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., Remboutsika, E., Chambon, P., and Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* 7, 729-739.

Nouman, G.S., Anderson, J.J., Crosier, S., Shrimankar, J., Lunec, J., and Angus, B. (2003a). Downregulation of nuclear expression of the p33^(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 56, 507-511.

Nouman, G.S., Anderson, J.J., Lunec, J., and Angus, B. (2003b). The role of the tumour suppressor p33^{ING1b} in human neoplasia. *J Clin Pathol* 56, 491-496.

Ogryzko, V.V., Hirai, T.H., Russanova, V.R., Barbie, D.A., and Howard, B.H. (1996a). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* 16, 5210-5218.

- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996b). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Oruetebarria, I., Venturini, F., Kekarainen, T., Houweling, A., Zuijderduijn, L.M., Mohd-Sarip, A., Vries, R.G., Hoebe, R.C., and Verrijzer, C.P. (2004). P16INK4a is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem* 279, 3807-3816.
- Palacios, A., Munoz, I.G., Pantoja-Uceda, D., Marcaida, M.J., Torres, D., Martin-Garcia, J.M., Luque, I., Montoya, G., and Blanco, F.J. (2008). Molecular basis of histone H3K4me3 recognition by ING4. *J Biol Chem* 283, 15956-15964.
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P., and Peters, G. (1997). Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* 15, 495-503.
- Palmero, I., Murga, M., Zubiaga, A., and Serrano, M. (2002). Activation of ARF by oncogenic stress in mouse fibroblasts is independent of E2F1 and E2F2. *Oncogene* 21, 2939-2947.
- Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-126.
- Palmero, I., and Serrano, M. (2001). Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 333, 247-256.
- Pang, J.H., and Chen, K.Y. (1994). Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J Cell Physiol* 160, 531-538.
- Pantoja, C., and Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18, 4974-4982.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5, 741-747.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., et al. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
- Pedoux, R., Sengupta, S., Shen, J.C., Demidov, O.N., Saito, S., Onogi, H., Kumamoto, K., Wincovitch, S., Garfield, S.H., McMenamin, M., et al. (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 25, 6639-6648.

- Peeper, D.S., Dannenberg, J.H., Douma, S., Riele Ht, H., and Bernards, R. (2001). Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by Ras. *Nat Cell Biol* 3, 198-203.
- Pena, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V.V., Gozani, O., Zhao, R., and Kutateladze, T.G. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 442, 100-103.
- Pena, P.V., Hom, R.A., Hung, T., Lin, H., Kuo, A.J., Wong, R.P., Subach, O.M., Champagne, K.S., Zhao, R., Verkhusha, V.V., et al. (2008). Histone H3K4me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor. *J Mol Biol* 380, 303-312.
- Prieur, A., and Peeper, D.S. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* 20, 150-155.
- Roninson, I.B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 63, 2705-2715.
- Sage, J., Miller, A.L., Perez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M., and Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223-228.
- Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E., and Chodosh, L.A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9, 493-505.
- Scott, M., Boisvert, F.M., Veyra, D., Johnston, R.N., Bazett-Jones, D.P., and Riabowol, K. (2001a). UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucleic Acids Res* 29, 2052-2058.
- Scott, M., Bonnefin, P., Veyra, D., Boisvert, F.M., Young, D., Bazett-Jones, D.P., and Riabowol, K. (2001b). UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* 114, 3455-3462.
- Schwarze, S.R., DePrimo, S.E., Grabert, L.M., Fu, V.X., Brooks, J.D., and Jarrard, D.F. (2002). Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 14877-14883.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Seshadri, T., and Campisi, J. (1990). Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247, 205-209.

- Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, K.H., Carrasco, D., Castrillon, D.H., Aguirre, A.J., Wu, E.A., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (2001). Loss of p16^{Ink4a} with retention of p19^{Arf} predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.
- Sharpless, N.E., Ramsey, M.R., Balasubramanian, P., Castrillon, D.H., and DePinho, R.A. (2004). The differential impact of p16^{INK4a} or p19^{ARF} deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-385.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?. *Cell* 102, 407-410.
- Shi, X., and Gozani, O. (2005). The fellowships of the ING's. *J Cell Biochem* 96, 1127-1136.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96-99.
- Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, A., Hashimoto, M., Asai, A., et al. (1999). Adenovirus-mediated transfer of p33^{ING1} with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res* 59, 5521-5528.
- Skowrya, D., Zeremski, M., Neznanov, N., Li, M., Choi, Y., Uesugi, M., Hauser, C.A., Gu, W., Gudkov, A.V., and Qin, J. (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* 276, 8734-8739.
- Soliman, M.A., Berardi, P., Pastryeva, S., Bonnefin, P., Feng, X., Colina, A., Young, D., and Riabowol, K. (2008). ING1a expression increases during replicative senescence and induces a senescent phenotype. *Aging Cell*.
- Soliman, M.A., and Riabowol, K. (2007). After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci* 32, 509-519.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., et al. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-198.
- Stanford, W.L., Epp, T., Reid, T., and Rossant, J. (2006). Gene trapping in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 420, 136-162.
- Takahashi, M., Seki, N., Ozaki, T., Kato, M., Kuno, T., Nakagawa, T., Watanabe, K., Miyazaki, K., Ohira, M., Hayashi, S., et al. (2002). Identification of the p33(ING1)-regulated genes that include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NMuMG. *Cancer Res* 62, 2203-2209.

- Taverna, S.D., Ilin, S., Rogers, R.S., Tanny, J.C., Lavender, H., Li, H., Baker, L., Boyle, J., Blair, L.P., Chait, B.T., et al. (2006). Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell* 24, 785-796.
- te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62, 1876-1883.
- Tsang, F.C., Po, L.S., Leung, K.M., Lau, A., Siu, W.Y., and Poon, R.Y. (2003). ING1b decreases cell proliferation through p53-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett* 553, 277-285.
- Tungteakkhun, S.S., and Duerksen-Hughes, P.J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 153, 397-408.
- Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665.
- Vieyra, D., Loewith, R., Scott, M., Bonnefin, P., Boisvert, F.M., Cheema, P., Pastryryeva, S., Meijer, M., Johnston, R.N., Bazett-Jones, D.P., et al. (2002). Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem* 277, 29832-29839.
- Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* 4, 311-319.
- Wei, W., Herbig, U., Wei, S., Dutriaux, A., and Sedivy, J.M. (2003). Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. *EMBO Rep* 4, 1061-1066.
- Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5598-5611.
- Xin, H., Yoon, H.G., Singh, P.B., Wong, J., and Qin, J. (2004). Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in Mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 9539-9546.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.

Ythier, D., Larrieu, D., Brambilla, C., Brambilla, E., and Pedeux, R. (2008). The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* 123, 1483-1490.

Zeremski, M., Hill, J.E., Kwek, S.S., Grigorian, I.A., Gurova, K.V., Garkavtsev, I.V., Diatchenko, L., Koonin, E.V., and Gudkov, A.V. (1999). Structure and regulation of the mouse *ing1* gene. Three alternative transcripts encode two phd finger proteins that have opposite effects on p53 function. *J Biol Chem* 274, 32172-32181.

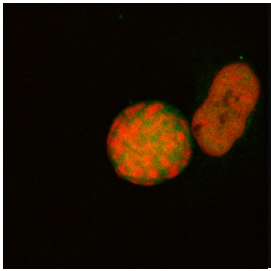
Zhang, R., and Adams, P.D. (2007). Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy. *Cell Cycle* 6, 784-789.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15, 2343-2360.

Zhu, J.J., Li, F.B., Zhu, X.F., and Liao, W.M. (2006). The p33ING1b tumor suppressor cooperates with p53 to induce apoptosis in response to etoposide in human osteosarcoma cells. *Life Sci* 78, 1469-1477.

Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, 203-211.



Anexos

El trabajo presentado en esta memoria de tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se adjuntan como anexos:

- Goeman, F., Thormeyer, D., Abad, M., Serrano, M., Schmidt, O., Palmero, I., and Baniahmad, A. (2005). Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* 25, 422-431.
- Abad, M., Menendez, C., Fuchtbauer, A., Serrano, M., Fuchtbauer, E.M., and Palmero, I. (2007). Ing1 mediates p53 accumulation and chromatin modification in response to oncogenic stress. *J Biol Chem* 282, 31060-31067.

Growth Inhibition by the Tumor Suppressor p33ING1 in Immortalized and Primary Cells: Involvement of Two Silencing Domains and Effect of Ras

Frauke Goeman,^{1†} Dorit Thormeyer,^{1‡} Maria Abad,² Manuel Serrano,³ Oliver Schmidt,¹ Ignacio Palmero,² and Aria Baniahmad^{1*}

Genetic Institute, Justus Liebig University, Giessen, Germany,¹ and Instituto de Investigaciones Biomédicas² and Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO,³ Madrid, Spain

Received 5 May 2004/Returned for modification 2 June 2004/Accepted 16 September 2004

ING1 was identified as an inhibitor of growth and has been described as a tumor suppressor. Furthermore, the expression of ING1 is induced in senescent cells and antisense ING1 extends the proliferative life span of primary human fibroblasts. Cooperation of p33ING1 with p53 has been suggested to be an important function of ING1 in cell cycle control. Intriguingly, it has been shown that p33ING1 is associated with histone acetylation as well as with histone deacetylation function. Here we show that p33ING1 is a potent transcriptional silencer in various cell types. However, the silencing function is independent of the presence of p53. By use of deletion mutants two potent autonomous and transferable silencing domains were identified, but no evidence of an activation domain was found. The amino (N)-terminal silencing domain is sensitive to the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) whereas the carboxy-terminal silencing function is resistant to TSA, suggesting that p33ING1 confers gene silencing through both HDAC-dependent and -independent mechanisms. Interestingly, the presence of oncogenic Ras, which is able to induce premature senescence, increases the p33ING1-mediated silencing function. Moreover, ING1-mediated silencing was reduced by coexpressing dominant-negative Ras or by treatment with the mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 but not by treatment with SB203580, an inhibitor of the p38 pathway. In addition, we show that both silencing domains of ING1 are involved in cell cycle control, as measured by inhibition of colony formation of immortalized cells and by thymidine incorporation of primary human diploid fibroblasts (HDF). Interestingly, p33ING1 expression induces features of cellular senescence in HDFs.

p33ING1 (for “inhibitor of growth 1”) was identified in a selection system for genes whose inactivation promotes neoplastic transformation (9, 15, 18). p33ING1 is a nuclear protein that has been shown to interact with the tumor suppressor p53, and overexpression of p33ING1 inhibits cell cycle progression in the G₁ phase in a p53-dependent manner (17, 35). The human p33ING1 locus encodes three different splice variants, leading to the production of proteins that share a common carboxy-terminal region but have various N termini with sizes of 47 kDa (p47ING1), 33 kDa (p33ING1), and 24 kDa (p24ING1) (21, 48). The C termini of these ING isoforms share homologies to the plant homeodomain zinc finger motif that is commonly found in chromatin-associated proteins (9). Recently other ING1-related genes termed p33ING2, p47ING3, p29ING4, and p28ING5 that are encoded by different genes were identified (15, 22). The ING protein family shows high conservation in the C termini, suggesting an important functional role of the C terminus of the ING gene family.

Aberrant expression of p33ING1 or mutations of p33ING1 have been found in primary tumors and tumor cell lines of

different origins, including neuroblastoma, lymphoid cell lines, breast cancer and cell lines, gastric cancer, and head and squamous cell carcinomas (6, 8, 21, 24, 28, 37–39, 41–43, 49, 55, 57). The human ING1 locus maps to chromosome 13q33–34, a site that is frequently associated with loss of heterozygosity in various types of cancers (16, 30, 47, 64).

Besides the interplay of p33ING1 and p53 in cell cycle control, both cooperate for other cellular functions. p33ING1 can sensitize cells to genotoxic stress in a p53-dependent manner (17). Furthermore, the repair mechanism induced by UV damage is enhanced by overexpression of p33ING1 and requires the participation of p53 (9).

Moreover, p33ING1 was shown to be involved in cellular life-span regulation. p33ING1 levels are increased in human senescent fibroblasts and epithelial cells, while inhibition of ING1 gene expression leads to replicative life-span extension of primary human fibroblasts (19, 50). Premature senescence was originally found to be induced by expression of the oncogenic Ras (Ras-Val12, RasV12) in primary human diploid fibroblasts (51).

Interestingly, it was reported that p33ING1 is associated with chromatin-modifying activity. p33ING1 is associated with the Sin3A corepressor complex and was shown to harbor a transcriptional repression function (29, 54, 62). Thereby, human p33ING1 associates in vivo with Sin3A, SAP30, HDAC1, RbAp48, and other proteins to form large protein complexes, whereas the splice variant p24ING1 does not. The association with the Sin3A complex and histone deacetylase (HDAC) ac-

* Corresponding author. Mailing address: Genetic Institute, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 58-62, 35392 Giessen, Germany. Phone: 49 641 99 35468. Fax: 49 641 99 35469. E-mail: Aria.Baniahmad@gen.bio.uni-giessen.de.

† F.G. and D.T. contributed equally.

‡ Present address: Fachklinik Hornheide, University Münster, 48157 Münster, Germany.

tivity is mediated by the p33ING1 N terminus, which is lacking in the splice variant p24ING1. In contrast, p33ING1 has also been shown to be associated with histone acetyltransferase activity (61) and to coactivate the estrogen receptor (56, 58).

We investigated the transcriptional properties of p33ING1 to define the protein domains involved in transcriptional regulation. We show that human p33ING1 harbors a strong transferable silencing function. The repression function is independent of the presence of functional p53. Deletion mapping revealed two transferable repression domains. One is localized in the N terminus and is TSA sensitive, while the other is located in the conserved C terminus and is TSA insensitive, indicating an HDAC-independent repression mechanism. In addition, the repression function of p33ING1 is enhanced by the Ras/Raf pathway. Furthermore, we show that both silencing domains are involved in cell cycle regulation by p33ING1 in immortalized and primary cells.

(Part of this work is included in the Ph.D. thesis of F. Goeman, Justus Liebig University, Giessen, Germany.)

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. cDNAs of human p33ING1 and p33ING1 deletions were cloned in frame into the pAB-gal₁₋₉₄ linker (1) or the pLPC vector (51) by use of standard cloning techniques. The reporter 17mer6x-tkCAT was described earlier (2). Expression vectors for Ras and Raf and the reporter UAS4x-tk-Luc were kindly provided by S. Tenbaum and P. Crespo. The telomerase promoter reporter construct (10) was obtained from S. Bacchetti and A. Farsetti, and the expression vector for human p53 was obtained from M. Dobbelstein.

Cell culture. The human lung carcinoma cell line H1299, monkey kidney cell line CV1, NIH 3T3 immortalized mouse fibroblasts, Ltk- transformed mouse fibroblasts, human kidney HEK 293T cells, and IMR90 primary human diploid fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin-streptomycin at 37°C with 5% CO₂.

Chicken erythrocyte HD3 cells were grown in 8% fetal calf serum and 2% chicken serum supplemented with penicillin-streptomycin at 41°C with 5% CO₂. DEAE-dextran transfection was carried out as described elsewhere (3). Calcium phosphate transfection was performed with minor changes according to the method of Banihmad et al. (4). Briefly, 6-well dishes were plated 4 to 12 h prior to addition of the DNA transfection cocrystals, which were generated by mixing DNA and HeBS (final concentrations, 0.137 M NaCl, 6 mM glucose, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, pH 7.2) with CaCl₂ (final concentration, 100 mM) through a 5-s vortexing and 20-min incubation step at room temperature. The following amounts of DNA were used: 0.9 µg of reporter, 0.9 µg of expression vector for Gal4 DNA-binding domain fusions, and 3.5 µg for Ras/Raf expression plasmids. The reporter pCMV-lacZ (0.2 µg) was used to standardize for transfection efficiency.

For trichostatin A (TSA) (Biomol) treatment, 0.9 µg of reporter and 2 µg of Gal expression vector were used. After overnight incubation with the DNA-CaPO₄ crystals, cells were washed and incubated for an additional 24 h (chloramphenicol acetyltransferase [CAT] reporter), 48 h (Luc reporter), or 72 h for Ras or Raf expression prior to harvest. Kinase inhibitors PD98059 and SB203580 (Calbiochem) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used at final concentrations of 10 and 25 µM, respectively. PD98059 and SB203580 were incubated for 25 h prior to cell harvest. DMSO-treated cells were used as controls. TSA dissolved in ethanol was added to the cells at a final concentration of 100 ng/ml 16 h after transfection. Cells were harvested 10.5 h after TSA or ethanol treatment.

Each set of experiments was performed at least three times. At least two different double-CsCl-gradient-purified plasmid preparations were used.

Retroviral transduction. Retroviral infection of human primary fibroblasts was done essentially as described elsewhere (44, 51), with minor modifications. In brief, IMR90 early-passage (<40 population doubling levels) human lung diploid fibroblasts, which had previously been infected with a retroviral vector driving expression of the ecotropic receptor, were used for retroviral transduction. For the production of virus, 293T cells were transiently transfected with the appropriate retroviral vector together with the pCLEco vector that encodes the ecotropic envelope protein (36). After 48 h, the supernatant containing viral particles was filtered, diluted 1 in 4 with fresh medium in the presence of 4 µg of

Polybrene/ml, and added to IMR90 cells seeded the previous day at a density of 8×10^5 cells per 10-cm-diameter dish. This procedure was repeated 24 h later. Successfully infected cells were selected with puromycin (2 µg/ml) for 3 to 5 days and used for the indicated assays. Senescence-associated β-Gal (SA-β-Gal) staining was carried out as described previously (11) by use of 40,000 cells per well in a 6-well plate.

Thymidine incorporation. For [³H]thymidine incorporation assays, 2×10^3 cells per well were seeded in triplicate in 96-well plates and the rate of [³H]thymidine incorporation was measured at several time points thereafter. For each point, 1 µCi of methyl-[³H]thymidine (Amersham) (46 Ci/mmol) was added to each well, and the amount of [³H]thymidine incorporated into DNA was measured 24 h later by use of an Inotech cell harvester apparatus and a Wallac Trilux 1450 Microbeta scintillation counter.

Colony formation assays. NIH 3T3 cells were plated into 6-well dishes (9×10^4 cells/well) and 24 h later were transfected with 3 µg of pLPC (empty vector control), pLPC-p33ING1 (full length), pLPC-p33ING1 (amino acids [aa] 1 to 171), and pLPC-p33ING1 (aa 171 to 279) by employing the CaPO₄ method. The transfection efficiency was controlled using cotransfected pCMV-lacZ and assayed for β-Gal activity prior to selection. At 48 h posttransfection the cells were transferred to 10-cm-diameter dishes and selected on 2 µg of puromycin/ml. After 2 weeks of selection the resistant colonies were fixed with 1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline, stained with crystal violet (0.1% in phosphate-buffered saline), and counted. The experiments were performed in triplicate and repeated three times.

RESULTS

The p33ING1 tumor suppressor protein is a potent transcriptional silencer in various cells. Members of the p33ING1 protein family are encoded by different genes with high sequence conservation in the carboxy-terminal region (Fig. 1A). The C termini exhibit homologies to the plant homeodomain. Also, the N termini of the p33ING1 family share significant sequence conservation, especially between p33ING1 and p33ING2, while the central parts share no or only limited homologies. Notably, the identified p33ING1 mutations isolated from tumors are mostly located in the highly conserved C-terminal part (Fig. 1A), indicating an important role for the p33ING1 C terminus (7, 8, 15, 21, 23). Since p24ING1 is a splice variant of p33ING1, the mutations are also present in that splice variant.

To test the transcriptional properties of p33ING1 in various cells we used the established Gal4 fusion system and generated a fusion of full-length p33ING1 with the DNA binding domain of Gal4 encompassing amino acids 1 to 94 that lacks the weak transactivation function between amino acid 94 and 147 (1). We have tested these fusions in various cell types, including CV1, Ltk-, HEK 293T, HD3, and NIH 3T3 cells, by use of the 17mer6x-tkCAT reporter (2). Compared to the Gal vector control, p33ING1 exhibited transcriptional silencing function in all cell types tested (Fig. 1B). The silencing function mediated by p33ING1 is dependent on the Gal fusion (data not shown). This effect was very high in 293T and HD3 cells (40- to 60-fold), whereas it was only moderate (5-fold) in NIH 3T3 fibroblasts, with CV1 and Ltk- cells giving intermediate values.

Thus, p33ING1 harbors transcriptional silencing function in various cell types.

The silencing function of p33ING1 is independent of the presence of p53. Because various p33ING1 functions have been shown to be dependent on the presence of the tumor suppressor p53, we analyzed whether the silencing function is dependent on p53 and/or whether the silencing can be modulated by p53. For this purpose we used the p53-negative human lung carcinoma cell line H1299 (34). Cotransfection experi-

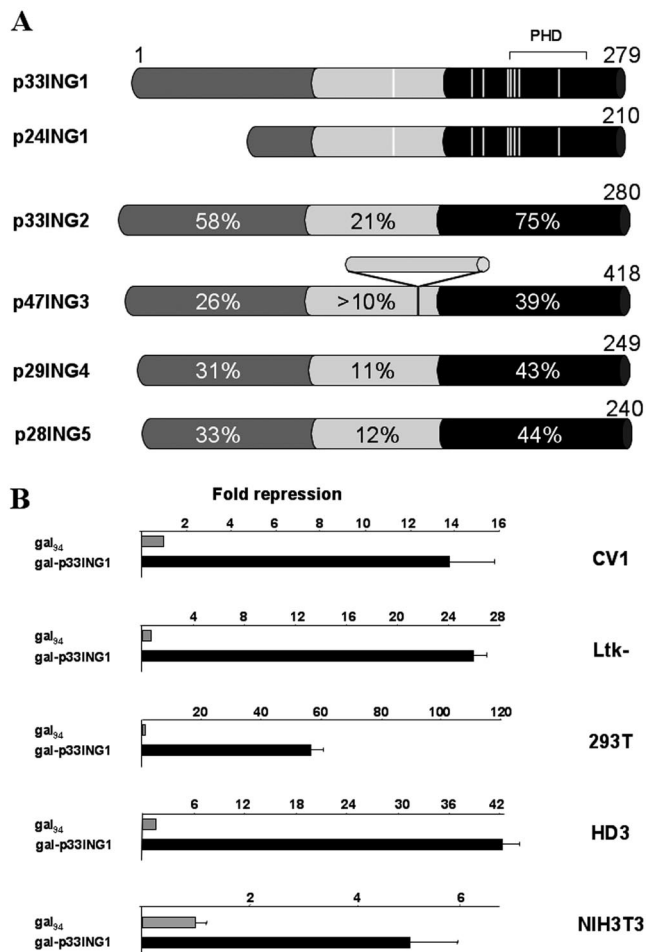


FIG. 1. The p33ING1 tumor suppressor protein harbors a potent transferable silencing domain functional in various cell types. (A) Schematic view of p33ING1 and its splice variant p24ING1 and homologies to other members of the ING1 protein family, which are encoded by different genes. The ING1 protein family shares a tripartite structure: a conserved N terminus, a nonconserved central part, and a highly conserved carboxy terminus. The percentages of identical amino acids in relation to p33ING1 are indicated. The positions of the previously identified mutations of p33ING1 are highlighted (white lines). PHD, plant homeodomain. (B) Various cell lines were cotransfected with expression vectors coding for the Gal4 DNA binding domain Gal₉₄ (amino acids 1 to 94) or the Gal-p33ING1 fusion together with the reporter 17mer6x-tkCAT. The mean of the values obtained with Gal₉₄ was set arbitrarily at 1, and the repression by the p33ING1 fusion is indicated. The data were normalized to the values obtained with the cotransfected β-Gal expression vector (pCMV-lacZ). The error bars represent deviations of the means from two independent transfections. Please note the different scaling parameters for individual graphs.

ments revealed that p33ING1 exhibits a strong silencing function in H1299 cells, suggesting that the ING-mediated repression is not dependent on the presence of p53 (Fig. 2A). Also, cotransfection of p53 did not significantly change the silencing function of p33ING1 (Fig. 2A). We have used a range from 50 to 500 ng of p53 expression plasmid without a significant effect on ING-mediated silencing (data not shown). As a positive control for p53 action in these cells we used the human TERT promoter, which is known to be repressed by p53 (26). As

expected, coexpression of 50 or 500 ng of p53 expression plasmid led to a strong repression of the human TERT promoter (Fig. 2B), indicating that p53 is functional in these cells. Thus, it suggests that p53 is not involved in p33ING1-mediated silencing and is not a corepressor for p33ING1.

To analyze the possibility of a vice versa situation—i.e., to determine whether p33ING1 acts as a corepressor for p53-mediated repression—specific promoters which are repressed by p53 were investigated. We chose three promoters, human TERT (Δ1009), multidrug resistance promoter (−1202), and the cyclin B1 (−287) promoter, previously established to contain p53 response elements and to be repressed by p53 (25, 33, 63). All three promoters were repressed by the presence of wild-type human p53 in H1299 cells. Since coexpression of full-length p33ING1 expression did not significantly change the repression mediated by p53 (unpublished data), this result indicates that p33ING1 does not act as a corepressor for p53.

Taken together, the data suggest that the transcriptional silencing mediated by p33ING1 is independent of the tumor suppressor p53 and vice versa; i.e., the p53-mediated gene repression is independent of p33ING1.

p33ING1 harbors two transferable silencing domains. To identify functional domains of p33ING1 with regard to activation and/or repression, a battery of overlapping and nonoverlapping Gal-p33ING1 fusions was generated and tested with different cell types (Fig. 3). In CV1 cells, both the N-terminal mutant (aa 1 to 76) and the C-terminal mutant (aa 171 to 279) harbor a transcriptional silencing function, while the central p33ING1 part (aa 76 to 171) exhibits only a weak repression function. This indicates that p33ING1 harbors at least two separable transcriptional silencing functions. To analyze the C-terminal conserved domain in more detail, overlapping deletions (aa 76 to 279 and 110 to 264) were created. These mutants exhibit similar abilities to silence transcription, as seen with the C-terminal conserved domain. However, the smaller p33ING1 mutant (aa 189 to 264) showed no significant repression function (Fig. 3). For 293T cells, both the N and C termini harbor strong silencing function, albeit at a reduced level compared to that seen with full-length p33ING1. The central part of ING1 (aa 76 to 171) and the mutant aa 189 to 264 only weakly repress promoter activity. Use of the combined central and C-terminal parts (aa 76 to 279) leads to a strong repression function to an extent similar to that seen with full-length p33ING1. As a control, the expression of those Gal-p33ING1 deletion mutants that exhibited weak or no silencing function was verified by Western blotting with cell extracts by use of an anti-Gal4 antibody (data not shown), indicating that the lack of transcriptional repression by the ING1 mutants is not due to lack of expression.

In H1299 cells, the N-terminal p33ING1 domain (aa 1 to 76) harbored a repression function, which is similar to the results seen with full-length p33ING1. The central part (aa 76 to 171) and the C terminus (aa 171 to 279) tested individually revealed weak repression function. In line with that result, the combination of the central part with the C terminus (aa 76 to 279), which corresponds to the p24ING1 splice variant, or the mutant aa 110 to 264 exhibited a silencing function, while the mutant aa 189 to 264 lacks a repression function (Fig. 3). This suggests that p33ING1 harbors two separable and strong trans-repression domains located in the N and C terminus. The

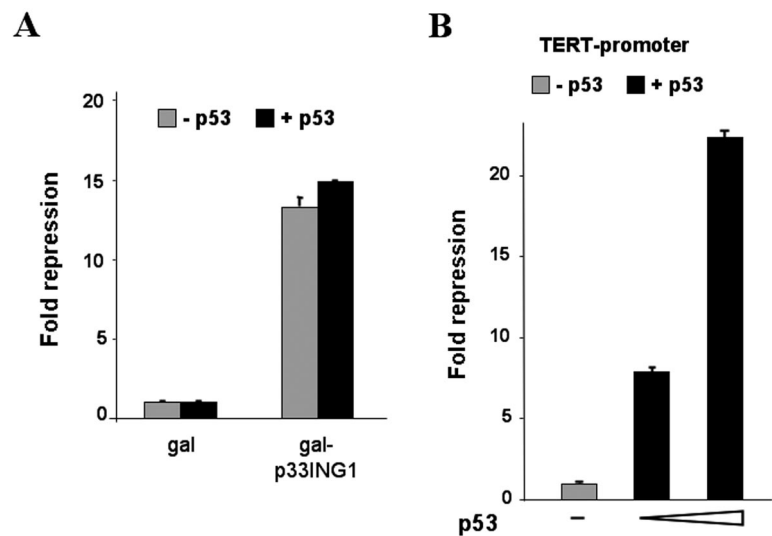


FIG. 2. Silencing function of p33ING1 is independent of the tumor suppressor p53. (A) The human lung carcinoma cell line H1299, lacking functional p53, was cotransfected with either Gal-1-94 or Gal-p33ING1 together with the reporter 17mer6x-tkCAT. The mean of the values obtained with Gal₉₄ was set arbitrarily at 1, and the severalfold repression obtained by the p33ING1 fusion is indicated. Black bars indicate values obtained with cotransfected p53 expression vector (100 ng), and gray-shaded bars indicate the values obtained with the empty control vector. The transfection efficiency was normalized with *lacZ* values. (B) As a control for p53 function in H1299 cells, the human telomerase promoter (Δ 1009 TERT-Luc) was used. The mean value obtained in the absence of p53 (empty vector) was set arbitrarily at 1 (gray bar). Cotransfection of 50 and 500 ng of the p53 expression vector led to repression of the TERT promoter (black bars). The error bars represent deviations of the means from two independent transfections.

central part has only a weak repression function but synergistically increases that of the conserved C terminus.

Taken together, these results indicate that p33ING1 harbors at least two strong repression domains and that one is localized in the N terminus and the other is localized in the conserved C terminus.

TSA-sensitive and -resistant silencing mediated by the p33ING1 tumor suppressor. It was previously shown that the Sin3A complex binds to the N terminus of p33ING1 but not to

p24ING1, suggesting that the first 70 aa of p33ING1 are essential for recruiting Sin3A and HDAC activity (29, 54). To delineate the mode of transcriptional repression of each of the p33ING1 silencing domains, the specific HDAC inhibitor TSA was used. As a positive control for HDAC-mediated repression and inhibition by TSA, the nuclear corepressor NCoR fused to the Gal4 DNA binding domain was included (Fig. 4). Addition of TSA led to a reduction of transcriptional repression by NCoR. Surprisingly, the full-length p33ING1 showed resis-

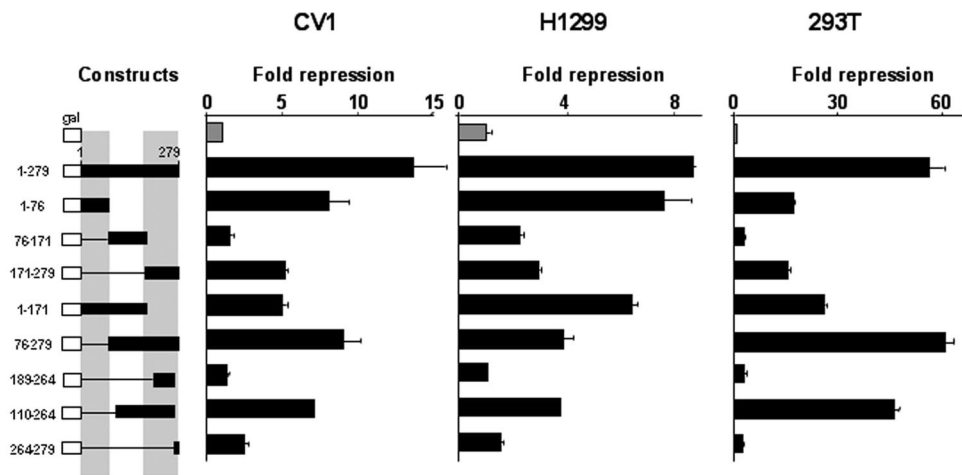


FIG. 3. Delineation of the silencing domains of p33ING1. The transcriptional effect of the indicated gal-p33ING1 deletion mutants on the activity of the reporter, 17mer6x-tkCAT, was analyzed in CV1, HEK 293T, and H1299 cells. The values obtained with Gal alone were set arbitrarily at 1. Values were normalized for transfection efficiency with *lacZ* values. The error bars represent the variations from the means of three independent transfections. The numbers indicate the positions of amino acids of the p33ING1 deletions. The gray underlying shadowed boxes indicate the two strong silencing domains in the N and C terminus of p33ING1. The error bars represent deviations of the means from two independent transfections.

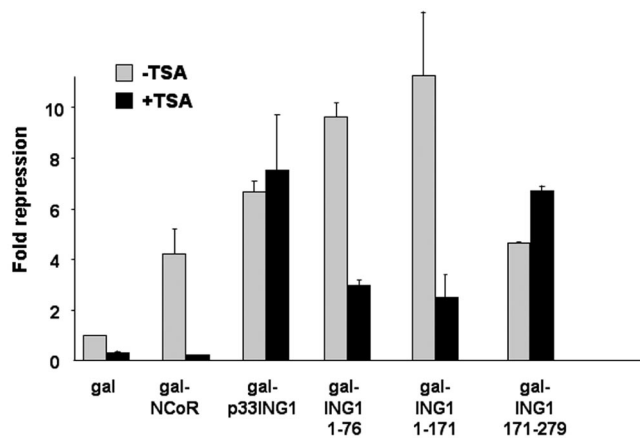


FIG. 4. Differential effects of TSA on the C- and N-terminal p33ING1 silencing domains. The HDAC inhibitor TSA (100 ng/ml) was used to test for HDAC-sensitive or -resistant silencing by treatment of CV1 cells transfected with full-length p33ING1 or deletions lacking the N-terminal or C-terminal silencing domain of p33ING1. Values obtained with Gal₉₄ in the absence of TSA were set arbitrarily at 1. As a positive control for TSA-sensitive silencing, Gal-NCoR was used. The error bars represent deviations of the means from two independent transfections.

tance to TSA treatment. Interestingly, the N- and C-terminal silencing domains exhibited differences in their responses to TSA. The activity of the p33ING1 N terminus (aa 1 to 76) was significantly reduced by the presence of TSA, which is in agreement with previous findings (29, 54). Similar results were obtained using p33ING1 aa 1 to 171. In contrast to NCoR results, we did not observe a complete relief of N-terminal-mediated

silencing by TSA. Notably, the C-terminal silencing function exhibits resistance to TSA treatment, indicating the presence of a silencing mechanism independent of HDAC activity. Although the promoter activity was in general enhanced by TSA treatment, an observation we made with several other promoters (13), the overall transcriptional silencing by p33ING1 remained potent.

Taken together, these results indicate that the N terminus of p33ING1 showed TSA sensitivity while the conserved C terminus exhibited TSA resistance. This indicates that p33ING1 uses HDAC-dependent and -independent mechanisms for transcriptional repression.

Ras increases p33ING1-mediated silencing. Prolonged expression of the oncogenic form of Ras in primary cells triggers a cell cycle arrest reminiscent of cellular senescence (51), which is mediated by the Raf–mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (31). As mentioned above, p33ING1 has been linked to cellular senescence. Furthermore, the particulars of regulation of p33ING1 function and its possible connection to mitogenic or antimitogenic pathways are largely unknown. On the basis of these findings, we decided to explore whether p33ING1 function might be influenced by Ras signaling. For this purpose, RasV12, the dominant active Ras, and, as a control, RasN17, the dominant-negative Ras, were each coexpressed together with Gal-p33ING1. Interestingly, coexpression of the dominant active RasV12 enhances the repression function of p33ING1 (Fig. 5A). In contrast, the dominant-negative RasN17 in part inhibits p33ING1-mediated silencing, most likely by interfering with endogenous Ras signaling. Since Ras mediates the signal transduction pathway through the Raf-MAPK pathway, we also tested Raf-BXB, the constitutively

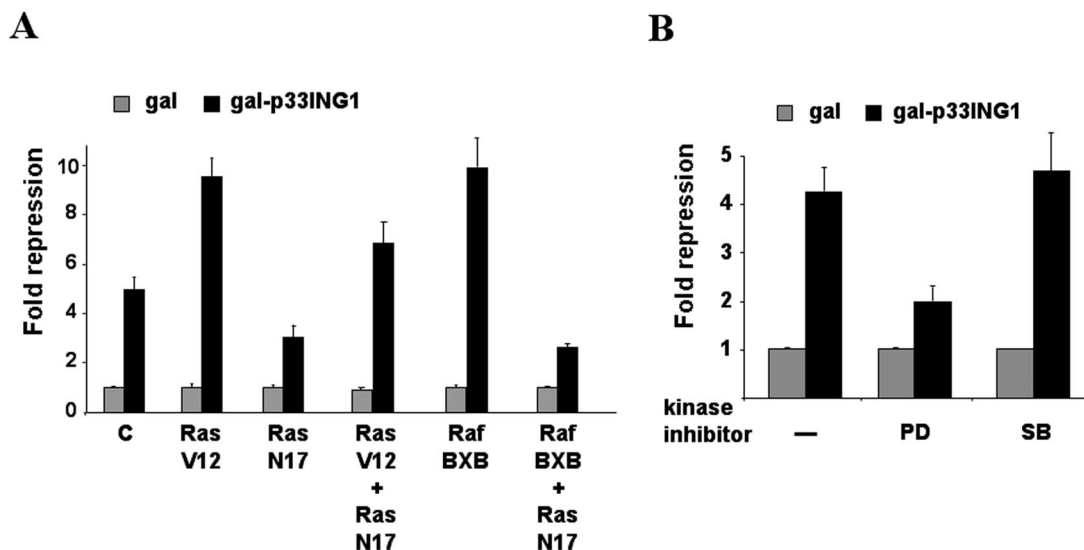


FIG. 5. The Ras signal transduction pathway enhances p33ING1-mediated gene silencing. (A) The effect of dominant active Ras (RasV12), dominant-negative Ras (RasN17), or constitutive active Raf (Raf BXB) on the Gal-p33ING1 full-length fusion in CV1 cells was analyzed. Expression vectors were cotransfected with the reporter UAS4x-tkLuc, and each experimental setup contained four independent transfections. The values obtained with Gal alone were set arbitrarily at 1. Values were normalized for transfection efficiency with *lacZ*. C, empty expression vector. (B) The inhibitor of MAPK (MEK) signaling PD98059 (PD) (10 μ M), the p38 kinase inhibitor SB203580 (SB) (25 μ M), and DMSO (vehicle) as a control were tested for their influence on p33ING1-mediated silencing in a setup similar to that described for panel A. The values obtained with Gal alone were set arbitrarily at 1. Values were normalized for transfection efficiency with *lacZ*. Only PD98059 inhibits p33ING1-mediated silencing.

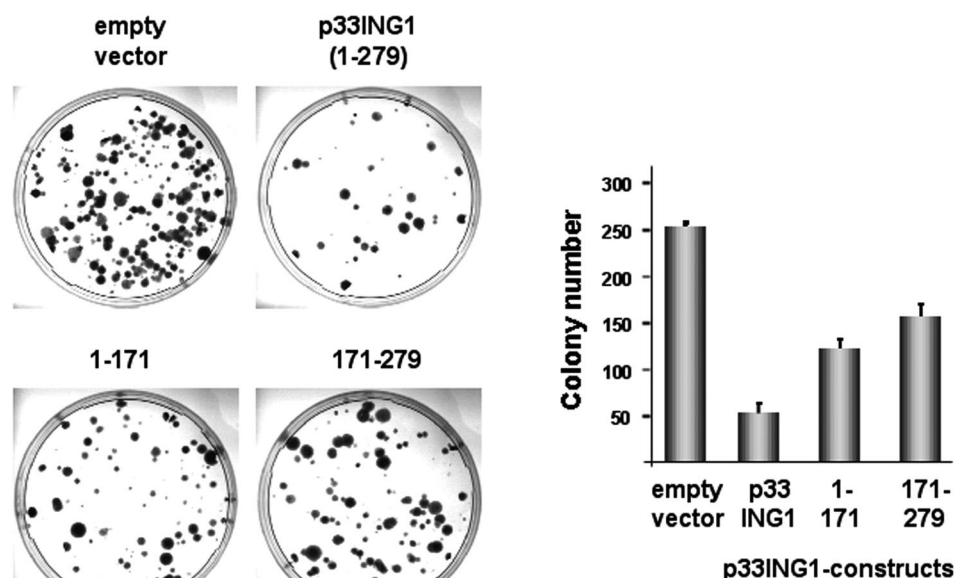


FIG. 6. The highly conserved ING1 C terminus is involved in cell growth regulation. A colony formation assay was performed using immortalized NIH 3T3 cells transfected with selectable expression vectors for full-length p33ING1 and the indicated ING1 deletions. The cell colonies were stained with crystal violet after selection with antibiotics for 2 weeks (left panel); the colony numbers were then counted and plotted in a graph (right panel). Each experiment set contained triplicates for the procedures performed for each of the constructs, which were repeated three times.

active Raf (12, 59) (Fig. 5A). The enhancement of p33ING1-mediated silencing by Raf-BXB was similar to the effect observed with RasV12. Coexpression of RasV12 or Raf-BXB together with RasN17 also led to a reduced silencing of p33ING1. This might be explained either through effects on the endogenous Ras signaling or through possible indirect effects of RasN17 on Raf action via other effector pathways (14). These results indicate that the Ras signal transduction pathway can modulate the silencing function of p33ING1.

As an additional verification, we used inhibitors of the endogenous MAPK-activated pathway in the presence of 10% serum (Fig. 5B). Treatment of cells with PD98059, a specific inhibitor of the ERK signaling pathway, led to reduced silencing function of p33ING1 to an extent similar to that seen with the coexpression of RasN17, suggesting that the p33ING1-mediated silencing is modulated by the Ras-ERK signaling. Notably, treatment with SB203580, a specific inhibitor of p38 MAPK, had no effect on p33ING1-mediated transcriptional silencing. These data indicate that activation of the Ras-Raf signal transduction pathway enhances p33ING1-mediated silencing through the ERK pathway.

The silencing domains of p33ING1 are involved in cell growth regulation. To analyze whether the silencing domains of p33ING1 are involved in cell cycle regulation, both immortalized NIH 3T3 and primary human diploid fibroblasts were used. Immortalized NIH 3T3 cells were stably transfected with either empty vector or expression vectors for full-length p33ING1, p33ING1 lacking the conserved C terminus, or the conserved C terminus alone. Cells were selected for stable integration for 2 weeks. The obtained colonies were stained and counted (Fig. 6). Compared to the results seen with the empty vector, expression of p33ING1 strongly reduced colony

numbers. This is in agreement with previous observations (29). Interestingly, the expression of the ING1 deletion lacking the C-terminal silencing domain (aa 1 to 171) resulted in reduced colony numbers, indicating that the C terminus plays an important role in inhibiting cell proliferation. In line with that result, expressing the highly conserved C terminus of ING1 (aa 171 to 279) alone led to reduced colony formation numbers. This indicates that the p33ING1 C terminus is involved in colony formation and cooperates with the N terminus in the full-length protein. No colonies were detected using untransfected or mock NIH 3T3 cells.

Taken together, these results indicate that p33ING1 and each of its silencing domains individually inhibit cell growth of immortalized cells.

To obtain more information about the importance of the silencing domains of p33ING1 in its antiproliferative action, we ectopically expressed p33ING1 and the deletion mutants in IMR90 human primary fibroblasts by retroviral transduction. As a control, we used a vector expressing oncogenic Ras, which causes a well-characterized cell cycle arrest reminiscent of senescence in this cell type (51). After a short selection, we analyzed the DNA synthesis rate and the morphology of infected cells. To estimate the division rate, we measured thymidine incorporation into newly synthesized DNA. This analysis revealed that full-length p33ING1 is a potent inhibitor of DNA synthesis in IMR90 cells comparable to oncogenic Ras (Fig. 7A). The thymidine uptake was inhibited approximately 10-fold relative to the results seen with empty-vector-infected cells. Next, we determined the consequences of the deletion of the C-terminal (aa 1 to 171) or the N-terminal (aa 171 to 279) silencing domain. In similarity to the results seen with NIH 3T3 cells, independent deletion of either silencing domain resulted

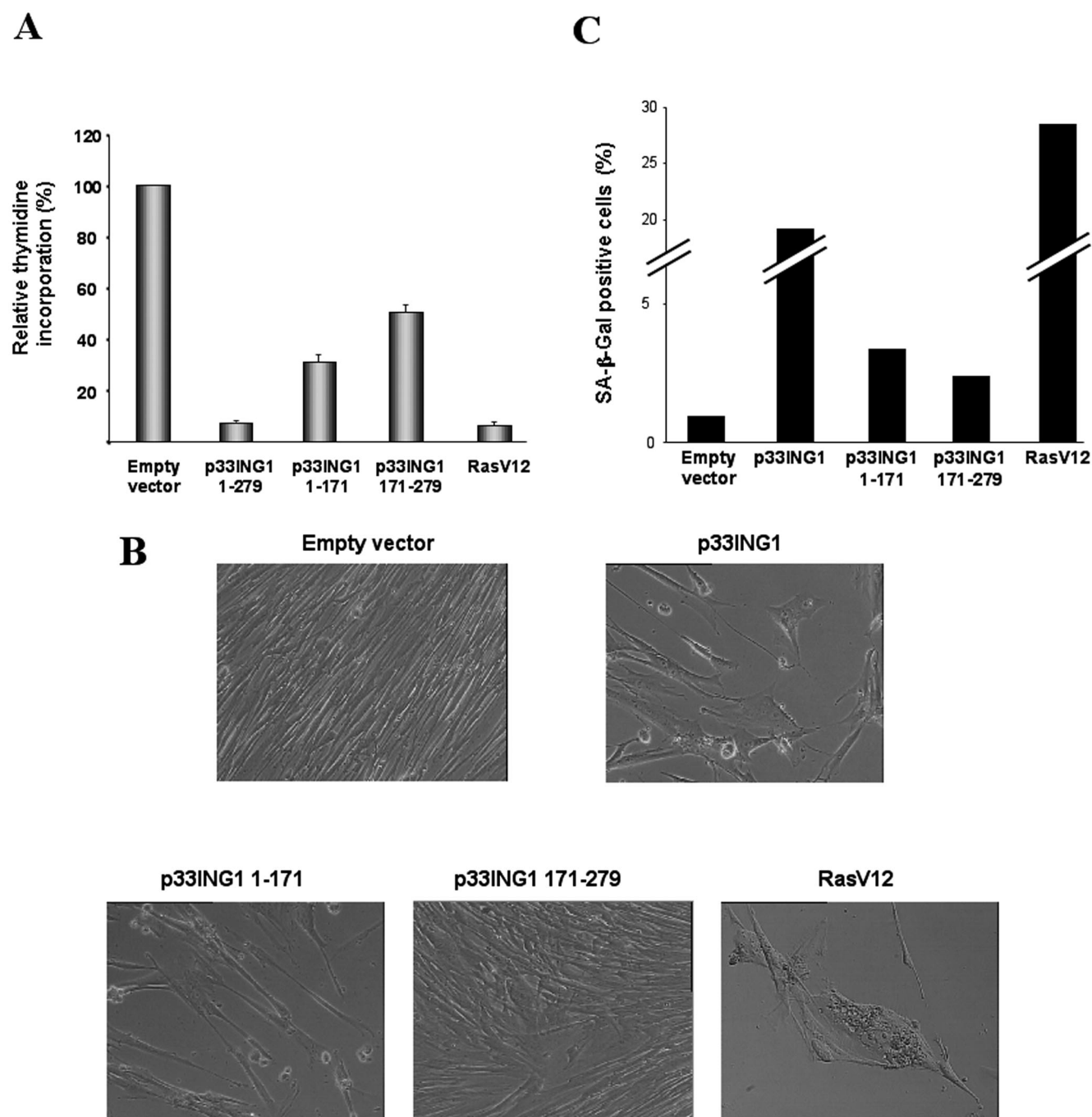


FIG. 7. ING1 induces morphological changes and growth arrest of primary human diploid fibroblasts. The human primary diploid fibroblasts expressing an ecotropic receptor were retrovirally transformed with selectable expression plasmids for the oncogenic Ras, RasV12, full-length p33ING1, and the indicated ING1 deletions. (A) Thymidine incorporation as an indicator of DNA synthesis. Triplicate experiments were performed, and the values obtained with the empty vector control were set arbitrarily at 100%. (B) Phase-contrast pictures of transduced human diploid fibroblasts with the indicated expression vectors. (C) Expression of SA-β-Gal. A total of 200 human primary diploid fibroblasts were counted each time; the percentages of cells expressing SA-β-Gal are shown.

in a partial reduction in the ability of p33ING1 to cause cell cycle arrest in IMR90 fibroblasts. The expression of p33ING1 and p33ING1 deletions was confirmed by both Western analysis (data not shown) and immunofluorescence (unpublished data), revealing that expression of the C-terminal silencing domain is weaker than that seen with full-length protein. This

may be indicative of an even more potent role of the C-terminal silencing domain in this aspect. These observations underline the important function of both transcriptional silencing domains in p33ING1 biological function.

Senescent human fibroblasts acquire a distinct cell morphology. In contrast to the thin, elongated shape of normal, actively

growing early-passage IMR90 cells, senescent counterparts display a flat, enlarged phenotype. As mentioned above, there are indications of a possible role of p33ING1 in senescence (19, 50). Therefore, we wished to determine whether the arrest induced by p33ING1 displays features of cellular senescence. Retroviral transduction with p33ING1 resulted in a change to senescence-like cell morphology, as documented by phase-contrast microscopy (Fig. 7B). Notably, the N terminus of p33ING1 induced morphological changes similar to those seen with the full-length protein, in agreement with its ability to cause cell cycle arrest, albeit at a reduced level. The changes in cell morphology caused by p33ING1 were similar to but not identical to those provoked by oncogenic Ras. In both cases, cells lost their normal thin and long shape; p33ING1-infected cells showed a morphology more similar to that seen with IMR90 cells that have reached senescence because of accumulation of population doublings, whereas Ras-infected cells were even larger and with a more irregular shape, in agreement with previous reports (31, 51).

A further characteristic of cellular senescence is the expression of specific senescence-associated SA- β -Gal (11). We tested for expression of SA- β -Gal activity in p33ING1-infected primary human fibroblasts by use of RasV12 as a control (Fig. 7C). In accordance with the previous observations, p33ING1 induces SA- β -Gal activity to a extent similar to that seen with oncogenic Ras, suggesting that p33ING1 has potency similar to that of RasV12. In addition, we analyzed the consequences of the deletion of either the C terminus (aa 1 to 171) or the N terminus (aa 171 to 279) in this assay. Both domains retain some ability to induce SA- β -Gal activity but to a much lesser extent than that seen with full-length p33ING1, which indicates that each of the silencing domains is involved in induction of SA- β -Gal activity.

Taken together, these results indicate that ectopic expression of p33ING1 in human diploid fibroblasts causes a cell cycle arrest with some features of cellular senescence and that the N and C termini cooperate in inducing cell cycle arrest.

DISCUSSION

We have characterized the transcriptional potential and effects on cell cycle regulation of the tumor suppressor p33ING1. Using a battery of ING1 deletion mutants, we have identified two potent silencing domains that were transferable to a heterologous protein and which are therefore defined as true functional silencing domains. Interestingly, these silencing domains are likely to exhibit their silencing function through different mechanisms. The N terminus of p33ING1 is associated with HDAC activity that is lost when the first 70 amino acids are deleted. The C terminus of ING1 harbors a potent silencing domain that is not TSA sensitive, suggesting that the highly conserved ING1 C terminus exerts an HDAC-independent mechanism for gene silencing which has not yet been elucidated. Since the full-length p33ING1-mediated silencing is TSA resistant, this result suggests that the C-terminal, TSA-resistant, silencing domain dominates over the N-terminal, TSA-sensitive, silencing domain in the full-length protein. Interestingly, comparing the ING proteins reveals that the C termini are highly conserved, indicating an important role for the C terminus. In line with that finding, naturally occurring

and tumor-associated mutations of p33ING1 were predominantly identified in its C terminus. This strongly points towards an important function localized in the C terminus of the ING family. We have observed a potent silencing function in the C terminus, implying that gene silencing is one of the important ING functions.

The association of p33ING1 with both HDACs and histone acetyltransferases has been described previously (29, 40, 54, 61). This suggests that p33ING1 may harbor intrinsically both transrepression and transactivation functions (27). However, under the conditions used we were unable to detect a transactivation function. This indicates either that p33ING1 does not harbor a transferable transactivation function or that p33ING1 associates with histone acetyltransferase activity under different conditions. Recently, it was reported that some ING proteins harbor a ligand-binding domain for phosphoinositides in the C terminus (20). However, the relevance of this interaction on ING1 protein function remains to be established.

Although a large number of p33ING1 functions are dependent on the presence of p53 (9, 17, 35, 52, 53, 60), the silencing function of p33ING1 is shown here to be independent of p53. This strongly suggests that silencing mediated by p33ING1 is one of the few known functions that are independent of p53 and is in agreement with recent reports of p53-independent transcriptional control by p33ING1 (27).

We have investigated the role of the Ras signal machinery in p33ING1 silencing and observed that activation of the Ras-Raf pathway enhances the silencing function of p33ING1. Using the dominant-negative Ras or the MEK-specific inhibitor PD98059 revealed that p33ING1-mediated silencing is reduced whereas significant silencing function is still being retained despite inhibiting the Ras signaling. This indicates that p33ING1 exerts its silencing function through both Ras-dependent and Ras-independent mechanisms. At present, we do not know the mechanism linking Ras to p33ING1 function, but it is not likely to involve a direct phosphorylation of p33ING1, since we have not been able to detect phosphorylation of p33ING1 by immunoprecipitates of p38, ERK, or JNK (data not shown). This suggests that the connection between the Ras transduction machinery and p33ING1 might instead involve the regulation of other genes and/or modification of other cellular factors.

In this report, we have also explored the correlation between the transcriptional repression of p33ING1 and its antiproliferative action. Supporting an important role for the two silencing domains we have described, we find that independent deletion of each of the domains severely impairs the effect of ING1 on cell cycle progression, both in mouse immortal cells and human primary fibroblasts. Having used the two separated silencing domains in combination, we have evidence that in the full-length protein each domain is more effective in mediating silencing as well as growth inhibition (unpublished data), indicating that some degree of cooperation exists in the full-length p33ING1. Our results have led us to a working model in which each silencing domain interacts with a distinct protein complex, allowing each silencing domain to act independently, whereas these protein complexes are able to interact with each other to enhance the silencing capability and growth regulation by p33ING1 only in the full-length situation.

The use of human primary fibroblasts has also allowed us to

investigate the possible involvement of p33ING1 in the implementation of cellular senescence. A participation of p33ING1 has previously been suggested on the basis of the increased levels of the protein with accumulation of population doublings in several cell types. Here, we have shown that ectopic expression of p33ING1 is sufficient to induce cell cycle arrest in human primary fibroblasts with some features of cellular senescence, suggesting an important role of p33ING1 in the implementation of the senescence arrest.

Chronic activation of the Ras promitogenic signaling pathway causes a senescence-like cell cycle arrest in primary fibroblasts (31, 51, 65). This response is associated with the induction of cell cycle inhibitors such as p16INK4a, p15INK4b, and p21CIP (5, 32, 45, 51) or the PML protein (46), among other changes. Here, we have shown on the one hand that ectopic expression of p33ING1 can similarly induce a cell cycle arrest with some features of cellular senescence and on the other hand that the p33ING1-mediated silencing is modulated by the Ras pathway. Taken together, these observations raise the possibility of an interplay between Ras and p33ING1 in the induction of senescence which we intend to explore in depth.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank J. M. Freije and C. Lopez-Otin for providing the p33ING1 cDNA, M. Dobbelstein for the p53 expression vector and H1299 cells, S. Bacchetti and A. Farsetti for providing the human telomerase promoter (TERT) construct, P. Crespo for Ras and Raf expression vectors, M. Rosenfeld for pCMX-gal-NCOR, G. Piaggio and K. Katula for the cyclin B1 reporter, and K. W. Scotto for the MDR1 reporter plasmid.

Part of this work was supported by the Graduiertenkolleg 370 (F.G.). This work has been supported by grants from the Spanish Ministry of Education (SAF03-00801) and the Cooperative Cancer Network of the Spanish Ministry of Health.

REFERENCES

- Baniahmad, A., I. Ha, D. Reinberg, S. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1993. Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8832–8836.
- Baniahmad, A., A. C. Kohne, and R. Renkawitz. 1992. A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO J.* **11**:1015–1023.
- Baniahmad, A., C. Steiner, A. C. Kohne, and R. Renkawitz. 1990. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* **61**:505–514.
- Baniahmad, A., D. Thormeyer, and R. Renkawitz. 1997. $\tau 4/\tau c/AF-2$ of the thyroid hormone receptor relieves silencing of the retinoic acid receptor silencer core independent of both $\tau 4$ activation function and full dissociation of corepressors. *Mol. Cell. Biol.* **17**:4259–4271.
- Brookes, S., J. Rowe, M. Ruas, S. Llanos, P. A. Clark, M. Lomax, M. C. James, R. Vatcheva, S. Bates, K. H. Vousden, D. Parry, N. Gruis, N. Smit, W. Bergman, and G. Peters. 2002. INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J.* **21**:2936–2945.
- Campos, E. I., K. J. Cheung, Jr., A. Murray, S. Li, and G. Li. 2002. The novel tumour suppressor gene ING1 is overexpressed in human melanoma cell lines. *Br. J. Dermatol.* **146**:574–580.
- Chen, B., E. I. Campos, R. Crawford, M. Martinka, and G. Li. 2003. Analyses of the tumour suppressor ING1 expression and gene mutation in human basal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **22**:927–931.
- Chen, L., N. Matsubara, T. Yoshino, T. Nagasaka, N. Hoshizima, Y. Shirakawa, Y. Naomoto, H. Isozaki, K. Riabowol, and N. Tanaka. 2001. Genetic alterations of candidate tumor suppressor ING1 in human esophageal squamous cell cancer. *Cancer Res.* **61**:4345–4349.
- Cheung, K. J., Jr., and G. Li. 2001. The tumor suppressor ING1: structure and function. *Exp. Cell Res.* **268**:1–6.
- Cong, Y. S., and S. Bacchetti. 2000. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J. Biol. Chem.* **275**:35665–35668.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9363–9367.
- Dorman, C. M., and S. E. Johnson. 1999. Activated Raf inhibits avian myogenesis through a MAPK-dependent mechanism. *Oncogene* **18**:5167–5176.
- Dressel, U., R. Renkawitz, and A. Baniahmad. 2000. Promoter specific sensitivity to inhibition of histone deacetylases: implications for hormonal gene control, cellular differentiation and cancer. *Anticancer Res.* **20**:1017–1022.
- Du, J., B. Jiang, R. J. Coffey, and J. Barnard. 2004. Raf and RhoA cooperate to transform intestinal epithelial cells and induce growth resistance to transforming growth factor beta. *Mol. Cancer Res.* **2**:233–241.
- Feng, X., Y. Hara, and K. Riabowol. 2002. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol.* **12**:532–538.
- Garkavtsev, I., D. Demetrick, and K. Riabowol. 1997. Cellular localization and chromosome mapping of a novel candidate tumor suppressor gene (ING1). *Cytogenet. Cell Genet.* **76**:176–178.
- Garkavtsev, I., I. A. Grigorian, V. S. Ossosvskaya, M. V. Chernov, P. M. Chumakov, and A. V. Gudkov. 1998. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* **391**:295–298.
- Garkavtsev, I., A. Kazarov, A. Gudkov, and K. Riabowol. 1996. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat. Genet.* **14**:415–420.
- Garkavtsev, I., and K. Riabowol. 1997. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33^{ING1} candidate tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **17**:2014–2019.
- Gozani, O., P. Karuman, D. R. Jones, D. Ivanov, J. Cha, A. A. Lugovskoy, C. L. Baird, H. Zhu, S. J. Field, S. L. Lessnick, J. Villaseñor, B. Mehrotra, J. Chen, V. R. Rao, J. S. Brugge, C. G. Ferguson, B. Payastre, D. G. Myska, L. C. Cantley, G. Wagner, N. Divecha, G. D. Prestwich, and J. Yuan. 2003. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**:99–111.
- Gunduz, M., M. Ouchida, K. Fukushima, H. Hanafusa, T. Etani, S. Nishioka, K. Nishizaki, and K. Shimizu. 2000. Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **60**:3143–3146.
- Gunduz, M., M. Ouchida, K. Fukushima, S. Ito, Y. Jitsumori, T. Nakashima, N. Nagai, K. Nishizaki, and K. Shimizu. 2002. Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene* **21**:4462–4470.
- Hara, Y., Z. Zheng, S. C. Evans, D. Malatjalian, D. C. Riddell, D. L. Guernsey, L. D. Wang, K. Riabowol, and A. G. Casson. 2003. ING1 and p53 tumor suppressor gene alterations in adenocarcinomas of the esophagogastric junction. *Cancer Lett.* **192**:109–116.
- Jager, D., E. Stockert, M. J. Scanlan, A. O. Gure, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, and Y. T. Chen. 1999. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res.* **59**:6197–6204.
- Johnson, R. A., T. A. Ince, and K. W. Scotto. 2001. Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J. Biol. Chem.* **276**:27716–27720.
- Kanaya, T., S. Kyo, K. Hamada, M. Takakura, Y. Kitagawa, H. Harada, and M. Inoue. 2000. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin. Cancer Res.* **6**:1239–1247.
- Kataoka, H., P. Bonnefin, D. Vieira, X. Feng, Y. Hara, Y. Miura, T. Joh, H. Nakabayashi, H. Vaziri, C. C. Harris, and K. Riabowol. 2003. ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res.* **63**:5785–5792.
- Krishnamurthy, J., K. Kannan, J. Feng, B. K. Mohanprasad, N. Tsuchida, and G. Shanmugam. 2001. Mutational analysis of the candidate tumor suppressor gene ING1 in Indian oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **37**:222–224.
- Kuzmichev, A., Y. Zhang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg. 2002. Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33^{ING1}. *Mol. Cell. Biol.* **22**:835–848.
- Leonard, C., J. L. Huret, and Gfco. 2002. [From cytogenetics to cytogenomics of bladder cancers]. *Bull. Cancer* **89**:166–173.
- Lin, A. W., M. Barradas, J. C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano, and S. W. Lowe. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**:3008–3019.
- Malumbres, M., I. Pérez De Castro, María I. Hernández, María Jiménez, T. Corral, and A. Pellicer. 2000. Cellular response to oncogenic Ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15^{INK4b}. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2915–2925.
- Manni, I., G. Mazzaro, A. Gurtner, R. Mantovani, U. Haugwitz, K. Krause, K. Engeland, A. Sacchi, S. Soddu, and G. Piaggio. 2001. NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G₂ arrest. *J. Biol. Chem.* **276**:5570–5576.
- Moore, M., N. Horikoshi, and T. Shenk. 1996. Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11295–11301.
- Nagashima, M., M. Shiseki, K. Miura, K. Hagiwara, S. P. Linke, R. Pedeux,

- X. W. Wang, J. Yokota, K. Riabowol, and C. C. Harris. 2001. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9671–9676.
36. Naviaux, R. K., E. Costanzi, M. Haas, and I. M. Verma. 1996. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* **70**:5701–5705.
37. Nouman, G. S., J. J. Anderson, S. Crosier, J. Shrimankar, J. Lunec, and B. Angus. 2003. Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J. Clin. Pathol.* **56**:507–511.
38. Nouman, G. S., J. J. Anderson, J. Lunec, and B. Angus. 2003. The role of the tumour suppressor p33 ING1b in human neoplasia. *J. Clin. Pathol.* **56**:491–496.
39. Nouman, G. S., B. Angus, J. Lunec, S. Crosier, A. Lodge, and J. J. Anderson. 2002. Comparative assessment expression of the inhibitor of growth 1 gene (ING1) in normal and neoplastic tissues. *Hybrid. Hybrid.* **21**:1–10.
40. Nourani, A., Y. Doyon, R. T. Utley, S. Allard, W. S. Lane, and J. Cote. 2001. Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7629–7640.
41. Ohmori, M., M. Nagai, T. Tasaka, H. P. Koeffler, T. Toyama, K. Riabowol, and J. Takahara. 1999. Decreased expression of p33ING1 mRNA in lymphoid malignancies. *Am. J. Hematol.* **62**:118–119.
42. Oki, E., Y. Maehara, E. Tokunaga, Y. Kakeji, and K. Sugimachi. 1999. Reduced expression of p33(ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer. *Cancer Lett.* **147**:157–162.
43. Oren, M. 1998. Tumor suppressors. Teaming up to restrain cancer. *Nature* **391**:233–234.
44. Palmero, I., and M. Serrano. 2001. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol.* **333**:247–256.
45. Paramio, J. M., C. Segrelles, S. Ruiz, J. Martin-Caballero, A. Page, J. Martinez, M. Serrano, and J. L. Jorcano. 2001. The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with p21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**:44203–44211.
46. Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P. P. Pandolfi, and P. G. Pelicci. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**:207–210.
47. Rasheed, B. K., and S. H. Bigner. 1991. Genetic alterations in glioma and medulloblastoma. *Cancer Metastasis Rev.* **10**:289–299.
48. Saito, A., T. Furukawa, S. Fukushima, S. Koyama, M. Hoshi, Y. Hayashi, and A. Horii. 2000. p24/ING1-ALT1 and p47/ING1-ALT2, distinct alternative transcripts of p33/ING1. *J. Hum. Genet.* **45**:177–181.
49. Sarela, A. I., S. M. Farmery, A. F. Markham, and P. J. Guillou. 1999. The candidate tumour suppressor gene, ING1, is retained in colorectal carcinomas. *Eur. J. Cancer.* **35**:1264–1267.
50. Schwarze, S. R., S. E. DePrimo, L. M. Grabert, V. X. Fu, J. D. Brooks, and D. F. Jarrard. 2002. Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**:14877–14883.
51. Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593–602.
52. Shimada, H., T. L. Liu, T. Ochiai, T. Shimizu, Y. Haupt, H. Hamada, T. Abe, M. Oka, M. Takiguchi, and T. Hiwasa. 2002. Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33(ING1) in T.Tn human esophageal carcinoma cells. *Oncogene* **21**:1208–1216.
53. Shinoura, N., Y. Muramatsu, M. Nishimura, Y. Yoshida, A. Saito, T. Yokoyama, T. Furukawa, A. Horii, M. Hashimoto, A. Asai, T. Kirino, and H. Hamada. 1999. Adenovirus-mediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res.* **59**:5521–5528.
54. Skowrya, D., M. Zeremski, N. Neznanov, M. Li, Y. Choi, M. Uesugi, C. A. Hauser, W. Gu, A. V. Gudkov, and J. Qin. 2001. Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J. Biol. Chem.* **276**:8734–8739.
55. Tokunaga, E., Y. Maehara, E. Oki, K. Kitamura, Y. Kakeji, S. Ohno, and K. Sugimachi. 2000. Diminished expression of ING1 mRNA and the correlation with p53 expression in breast cancers. *Cancer Lett.* **152**:15–22.
56. Toyama, T., and H. Iwase. 2004. p33ING1b and estrogen receptor(ER) α -pha. *Breast Cancer* **11**:33–37.
57. Toyama, T., H. Iwase, P. Watson, H. Muzik, E. Saettler, A. Magliocco, L. DiFrancesco, P. Forsyth, I. Garkavtsev, S. Kobayashi, and K. Riabowol. 1999. Suppression of ING1 expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* **18**:5187–5193.
58. Toyama, T., H. Iwase, H. Yamashita, Y. Hara, H. Sugiura, Z. Zhang, I. Fukai, Y. Miura, K. Riabowol, and Y. Fujii. 2003. p33(ING1b) stimulates the transcriptional activity of the estrogen receptor α via its activation function (AF) 2 domain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **87**:57–63.
59. Troppmair, J., J. Hartkamp, and U. R. Rapp. 1998. Activation of NF-kappa B by oncogenic Raf in HEK 293 cells occurs through autocrine recruitment of the stress kinase cascade. *Oncogene* **17**:685–690.
60. Tsang, F. C., L. S. Po, K. M. Leung, A. Lau, W. Y. Siu, and R. Y. Poon. 2003. ING1b decreases cell proliferation through p53-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* **553**:277–285.
61. Vieyra, D., R. Loewith, M. Scott, P. Bonnefin, F. M. Boisvert, P. Cheema, S. Pastryeva, M. Meijer, R. N. Johnston, D. P. Bazett-Jones, S. McMahon, M. D. Cole, D. Young, and K. Riabowol. 2002. Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **277**:29832–29839.
62. Xin, H., H. G. Yoon, P. B. Singh, J. Wong, and J. Qin. 2004. Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**:9539–9546.
63. Xu, D., Q. Wang, A. Gruber, M. Bjorkholm, Z. Chen, A. Zaid, G. Selivanova, C. Peterson, K. G. Wiman, and P. Pisa. 2000. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* **19**:5123–5133.
64. Zeremski, M., S. K. Horrigan, I. A. Grigorian, C. A. Westbrook, and A. V. Gudkov. 1997. Localization of the candidate tumor suppressor gene ING1 to human chromosome 13q34. *Somat. Cell Mol. Genet.* **23**:233–236.
65. Zhu, J., D. Woods, M. McMahon, and J. M. Bishop. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12**:2997–3007.

Ing1 Mediates p53 Accumulation and Chromatin Modification in Response to Oncogenic Stress^{*[S]}

Received for publication, February 23, 2007, and in revised form, August 6, 2007 Published, JBC Papers in Press, August 10, 2007, DOI 10.1074/jbc.M701639200

María Abad^{†1}, Camino Menéndez^{†1,2}, Annette Füchtbauer[§], Manuel Serrano[¶], Ernst-Martin Füchtbauer[§], and Ignacio Palmero^{‡3}

From the [†]Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, E-28029 Madrid, Spain, the [§]Department of Molecular Biology, Aarhus University, DK-8000 Aarhus, Denmark, and [¶]Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, E-28029 Madrid, Spain

ING proteins are putative tumor suppressor proteins linked to the p53 pathway and to the chromatin modification machinery. Here we have analyzed the role of the products of the murine *Ing1* locus in cellular tumor-protective responses, using mouse primary fibroblasts where the *Ing1* locus has been inactivated by the integration of a β geo cassette. We show that *Ing1*-deficient mouse embryonic fibroblasts display a defective senescence-like antiproliferative response against oncogenic Ras, affecting several senescence-specific markers. This phenotype is accompanied by a reduced accumulation of p53, which can be explained by the reduced basal p53 protein stability in the *Ing1*-deficient background. *Ing1* deficiency also results in defects in the appearance of heterochromatic marks upon expression of oncogenic Ras, suggestive of impaired heterochromatin formation during oncogene-induced senescence. Our results support an important role for the *Ing1* locus in protection against oncogenic stress *in vivo*, both as a mediator of p53 activation and as a regulator of chromatin remodeling processes.

Normal mammalian cells are endowed with defense mechanisms against potentially tumorigenic alterations, among which the pathway controlled by p53 plays a critical role (1). The ING family of proteins includes several sequence-related and evolutionarily conserved proteins, connected both with the p53 pathway and with chromatin modification processes (reviewed in Refs. 2 and 3). In humans and mice, several ING peptides have been identified, which are encoded by five different loci, named ING1 to ING5. Several ING proteins have been shown to act as upstream regulators of p53 in overexpression

experiments, either increasing p53 protein stability (4) or promoting the acetylation of Lys residues at the C terminus of p53 (5, 6). The latter effect is likely mediated by the association of ING proteins to acetyltransferases such as CBP/p300 or PCAF (7) or deacetylases such as Sir2 (6). ING proteins also participate in the regulation of chromatin dynamics. They form part of large multiprotein complexes with both activating and repressing chromatin-modifying activities, in association with histone acetyltransferases or deacetylases (8–10), and also act as effector proteins recognizing specific histone marks (10–13). Enforced expression of ING proteins activates a variety of responses, such as cell cycle arrest (14), DNA repair (15), apoptosis (16), or cellular senescence (17, 18). In support of a possible role as tumor suppressors in human cancer, alterations in ING1, and other members of the ING family, have been described in different types of human tumors, including altered expression and aberrant subcellular localization and, less frequently, point mutation or homozygous deletion (19, 20). The physiological significance of the *in vitro* data described above and the actual role of ING proteins in tumor-protective responses *in vivo* remain to be unequivocally tested. In this study, we have used primary embryonic fibroblasts derived from transgenic mice where the *Ing1* locus has been disrupted by a gene trap cassette to address the participation of the products of this locus in p53-mediated cellular responses to stress. We find that *Ing1* deficiency results in defects in p53 activation and chromatin remodeling, in the context of the protective response against oncogenic stress in murine fibroblasts, suggesting a critical role for the *Ing1* locus in cellular senescence triggered by oncogenic stress.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of *Ing1* Gene Trap Mice—The generation and phenotypical characterization of the *Ing1* gene trap mice will be described in detail elsewhere. Essentially, murine embryonic stem cells (TBV-2) were electroporated with the gene trap vector pT1ATG β geo as part of a genome-wide gene trapping screen (21). The integration site of selected clones was identified by nucleotide sequencing, using a semi-automated 5'-rapid amplification of cDNA ends-PCR protocol. One clone with a single copy insertion in the murine *Ing1* locus was used to generate chimeric mice by blastocyst injection, and germ line transmitting animals were bred to generate mice with targeted *Ing1* alleles.

^{*} This work was supported in part by Grant BFU-06-10882 from the Spanish Ministry of Education, the FMMA Foundation, the Cooperative Cancer Network of the Spanish Ministry of Health (to I. P.), Grant DP00086 from the Danish Cancer Society, Grant 21-03-0591 from the Danish Research Council (to E.-M. F.), and European Union Grant INTACT (to M. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4.

[†] Both authors contributed equally to this work.

² Recipient of a predoctoral fellowship from the Regional Government of Madrid.

³ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-585-4491; Fax: 34-91-585-4401; E-mail: ipalmero@iib.uam.es.

Cell Culture—Preparation and passage of MEFs⁴ and retroviral infection experiments were carried out as described previously (22). Fibroblasts from individual embryos from over 10 different litters were used in the study. The proliferation rate was estimated by counting the number of BrdUrd-positive cells by immunofluorescence (14). For protein turnover assays, cycloheximide (Sigma) was added to the medium at a final concentration of 30 μ g/ml. For growth curves, after infection and selection, cells were seeded at a density of 2×10^4 per well in 24-well dishes. At the indicated time points, cells were trypsinized and counted. Senescence-associated β -galactosidase activity was detected as described previously (22).

Western Blotting Analysis—Preparation of total cell lysates, electrophoresis, and Western blot analysis were carried out as described (23). The following antibodies were used: anti-p33 ING1 (LG-1, a rabbit polyclonal against the C terminus of the human p33 ING1 protein; 1:1000 dilution), anti-p53 (CM-5, Novocastra; 1:500), anti-p19 ARF (54-75, a gift of David Parry, DNAX; 1:500), anti-p16 INK4a (M156, Santa Cruz Biotechnology; 1:100), anti-p21 CIP1 (sc-397, Santa Cruz Biotechnology; 1:500), anti-acetyl-p53 (Lys-373) (06-758, Trevigen; 1:100), anti-phospho-p53 (Ser-15) (16G8, Cell Signaling; 1:500), anti-H-Ras (sc-35, Biotechnology; 1:100), and anti-DcR2 (AAP-371C, StressGen; 1:250). An antibody against β -actin (AC-15, Sigma; 1:10,000) was used to control for equal loading.

Immunoprecipitation—Immunoprecipitation was carried out essentially as described previously (14). Ten microliters of agarose-conjugated anti-p53 antibody slurry (sc-6243AC, Santa Cruz Biotechnology) were used for immunoprecipitation from total cell lysates. The immunocomplexes were resolved in 8% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes for 3 h in 10% SDS.

RT-PCR—Total RNA was prepared from asynchronously growing MEFs of early passage, using TRI Reagent (Sigma), and used to synthesize cDNA by reverse transcription, which was subsequently used for standard PCRs or real time quantitative PCR. The primers used are as follows: *Ing1* exon 1a forward, 5'-CCTTCTCGTCCAGATTGG-3'; *Ing1* exon 1b forward, 5'-ATGTTGAGTCCTGCCAACGG-3'; *Ing1* exon 1b reverse, 5'-CTTGGTATTTGGCGTCGATCTCC-3'; *Ing1* exon 1c forward, 5'-ATCGCTTGTGCGGTTTCC-3'; *Ing1* exon 2 reverse, 5'-CTACCTGTTGTAAGCCC-3' (for standard PCR); and 5'-ACCAGCTCCACCATCTGACT-3' (for quantitative PCR assays); β -Geo reverse, 5'-GATGTGCTGCAAGGCGA-TTA-3'; *Ing2* forward, 5'-CAGCAGCAGCTGTACTCG-3'; *Ing2* reverse, 5'-ATCACAGTCGTCAATCCCG-3'; β -actin forward, 5'-TTGTAACCAACTGGGACGACATGG-3'; β -actin reverse, 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'. For quantitative PCR, a Corbett Research Rotor Gene apparatus was used, following the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence—Immunofluorescence was carried out essentially as described in Gonzalez *et al.* (14). p53 was detected with antibody CM5 (1:250 dilution) and p19 ARF with antibody 54-75 (1:250 dilution). Histone 3 trimethylated in Lys-9 (H3K9) was detected with antibody MAB3450 from Chemicon, and

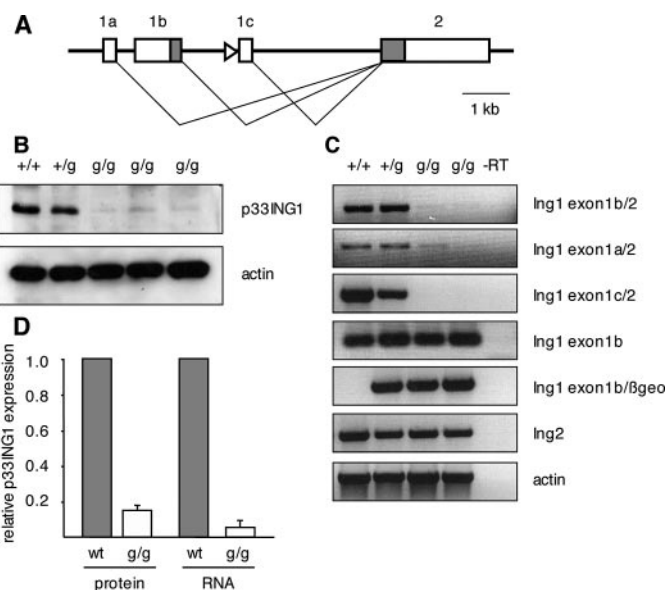


FIGURE 1. Effects of the integration of the β Geo cassette on the expression of the murine *Ing1* locus. A, schematic representation of the structure of the *Ing1* locus. Protein-coding regions in exon 1b and 2 are shaded. The site of integration of the β Geo cassette is indicated by an arrowhead. B, Western blot analysis of the expression of p33 ING1 in MEFs of the indicated genotypes. C, RT-PCR analysis of the expression of the alternative transcripts of the *Ing1* locus in MEFs of the indicated genotypes. Exon1b/ β Geo represents the fusion transcript between exon 1b of *Ing1* and the gene trap cassette. Expression of *Ing2* and actin was also analyzed. D, quantitation of p33 ING1 protein and RNA levels. Protein levels were quantitated from scans of Western blots. RNA levels were quantitated using real time PCR. In both cases, actin was used for normalization. wt, wild type; g/g, *Ing1* gene trap.

HP1 γ with antibody 07-442 was from Upstate (both at a 1:2000 dilution). The secondary antibodies used were Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit, Alexa 488-conjugated goat anti-mouse, and Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit (from Molecular Probes; 1:500 dilution). For quantitation of the staining intensities of heterochromatin markers in individual cells, regions of interest were defined so that they would fit in all nuclei, and the intensity for each channel was measured for all the individual regions of interest, using the Leica confocal image analysis software. At least 100 cells, from at least two different slides, were used for quantitation.

RESULTS

Characterization of *Ing1*-deficient MEFs—The murine *Ing1* locus contains four exons (1a, 1b, 1c, and 2), which give rise to three different transcripts through alternative splicing events (Fig. 1A). Their translation is predicted to give rise to two peptides: p33 ING1 (from an ATG codon in exon 1b) and p24 (from an internal ATG in exon 2) (24). We have mapped the site of integration of the β Geo cassette to the intron between exons 1b and 1c, 67 bp upstream of the start of exon 1c (Fig. 1A). Western blot analysis with a polyclonal antiserum against the C terminus of p33 and p24, in wild-type MEFs, revealed a band with a relative mobility of ~ 37 kDa, corresponding to p33 ING1 (Fig. 1B) (24). A specific band with a mobility corresponding to p24 was never detected in our experiments. Western blot analysis in gene trap MEFs revealed a weak band of the same mobility as p33 ING1, most likely reflecting residual expression of the wild-type transcript, because of splicing around the gene trap inser-

⁴ The abbreviations used are: MEF, mouse embryonic fibroblast; RT, reverse transcription; BrdUrd, bromodeoxyuridine.

Impaired Oncogenic Stress Response in *Ing1*-deficient Cells

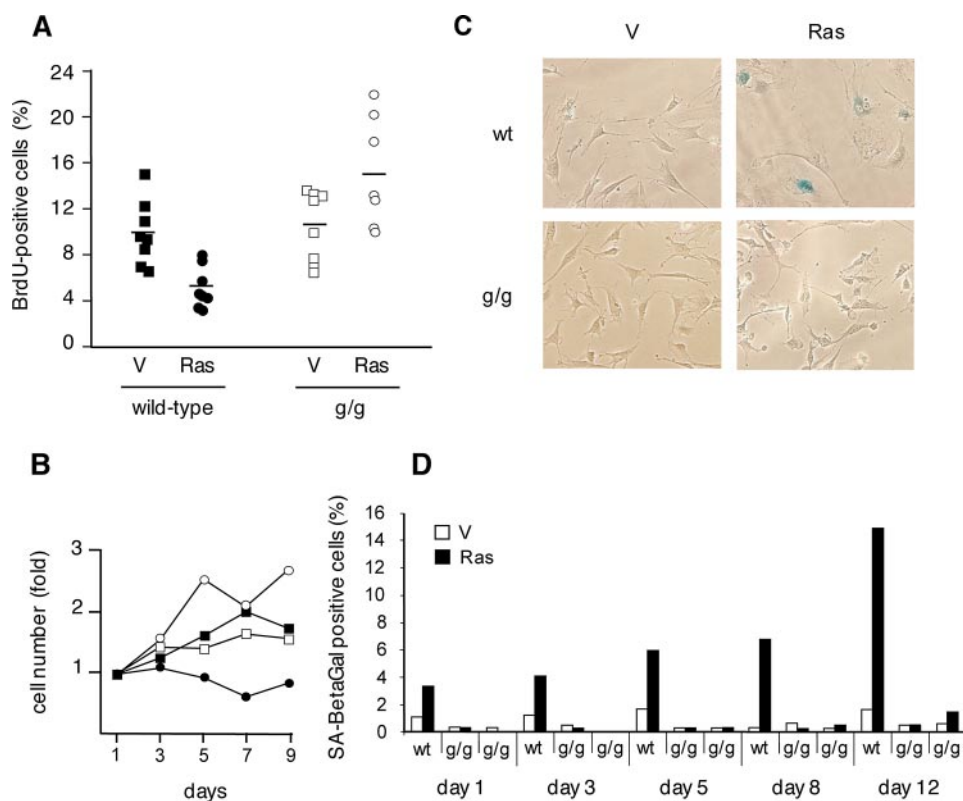


FIGURE 2. Response to oncogenic Ras. *A*, rate of BrdUrd incorporation of MEFs of the indicated genotypes infected with a vector expressing RasV12 (*Ras*) or an empty vector (*V*). *B*, growth curves of wild-type (wt) MEFs infected with vector (filled squares) or RasV12 (filled circles), and g/g MEFs infected with empty vector (empty squares) or RasV12 (empty circles). Cell number was counted at the indicated time points, and it is represented relative to the number of cells at day 1 in each case. *C*, micrograph showing the morphology and senescence-associated β -galactosidase staining of fibroblasts after retroviral infection with the indicated vectors ($\times 100$ magnification). *D*, percentage of senescence-associated β -galactosidase (SA-BetaGal)-positive MEFs of wild-type and g/g genotype, at the indicated time points after infection and selection with RasV12 (*Ras*) or empty vector (*V*). A representative experiment is shown with one wild-type and two g/g MEF preparations.

tion. Consistent with this result, RT-PCR analysis revealed a weak and barely detectable band for the wild-type transcript containing exons 1b and 2 in MEFs homozygous for the gene trap insertion. Similarly, the expression of the transcripts containing exon 1a or exon 1c was significantly reduced in the gene trap fibroblasts (Fig. 1C). The dramatic effect observed for the exon 1c-containing transcript is likely caused by the disruption of regulatory sequences in the exon 1c promoter by the integration of the β geo cassette (Fig. 1A). Quantitative RT-PCR indicates that the amount of the 1b transcript in the gene trap MEFs is reduced to around 5% of wild-type levels. Similarly, the amount of p33 ING1 protein in the gene trap cells was reduced to ~15% of normal levels (Fig. 1D). Among ING proteins, ING2 is the family member most closely related to ING1, both in terms of sequence and function (9). To rule out possible compensation by other members of the ING family, we looked at the expression of the ING2 transcript by RT-PCR, and we found no significant differences between gene trap and wild-type cells (Fig. 1C). These results prove that the insertion of the gene trap cassette in the murine *Ing1* locus has resulted in a dramatic reduction of the expression levels of all *Ing1* transcripts and p33 ING1 protein, and they validate homozygous *Ing1* gene trap MEFs (*Ing1*^{Bgeo/Bgeo}, hereafter designated as g/g MEFs) as a valuable cellular model to study the impact of the deficiency of the products of this locus.

Impact on Ras-induced Senescence—Chronic expression of an oncogenic version of the Ha-Ras oncogene (RasV12) triggers an antiproliferative response in primary cells, reminiscent of cellular senescence (25). In MEFs, this response is mediated primarily by the ARF-p53 pathway (25, 26) and involves the stabilization and specific post-translational modifications of p53 (27, 28). Given the well established link of p33 ING1 to p53, and its putative role as a tumor suppressor gene, we decided to test the impact of *Ing1* depletion in Ras-induced cell cycle arrest, a tumor-protective response mediated by p53. First, we measured the proliferation rate of retrovirally infected MEFs of both genotypes by BrdUrd incorporation. As expected, wild-type MEFs expressing RasV12 showed a clear reduction in the number of BrdUrd-positive cells, relative to vector-infected controls. *Ing1* g/g MEFs, in contrast, were largely insensitive to the effect of Ras and showed a rate of BrdUrd-positive cells similar to or even higher than their controls (Fig. 2A and supplemental Fig. 1). The different response to Ras was also evident when we measured the

growth rate of infected fibroblasts of both genotypes, over a period of 9 days post-selection. Although wild-type MEFs with Ras virtually did not increase in cell number during that period, *Ing1*-deficient MEFs with Ras grew at a rate slightly faster than their controls (Fig. 2B). Also, although Ras-infected wild-type MEFs displayed markers of the senescent phenotype, such as the senescence-associated β -galactosidase staining and a distinctive flattened morphology, *Ing1*-deficient MEFs retained a normal morphology and very low number of senescence-associated β -galactosidase-positive cells (Fig. 2, C and D). We wished to determine whether the attenuation in the antiproliferative response to Ras rendered *Ing1*-deficient cells fully permissive to Ras-induced transformation. With this purpose, infected fibroblasts were injected in the flank of nude mice, and the appearance of visible tumors was scored. No tumors were observed in wild-type or *Ing1*-deficient MEFs expressing oncogenic Ras, after up to 40 days, in conditions where Ras-infected p53-null MEFs formed sizable tumors (supplemental Fig. 2). Furthermore, no evidence of oncogenic transformation of *Ing1*-deficient cells was either observed in soft agar colony assays or foci formation assays (data not shown). Interestingly, the impact of *Ing1* deficiency appears to be specific to the response to oncogenic stress, whereas other p53-mediated phenotypes we have studied in this and other cell types were not altered. For instance, g/g MEFs enter replicative senescence and reach

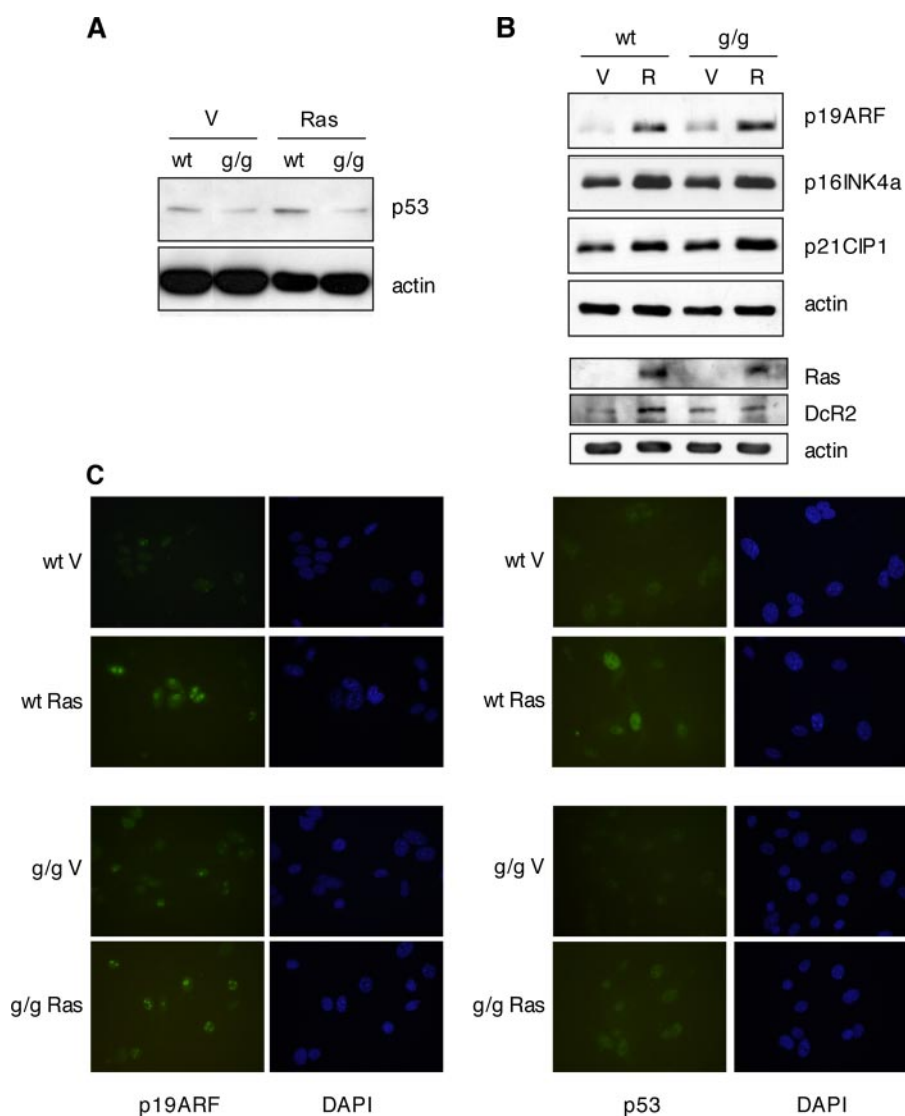
Impaired Oncogenic Stress Response in *Ing1*-deficient Cells

FIGURE 3. A and B, Western blot analysis of the levels of p53 (A), p19 ARF, p16 INK4a, p21 CIP1, and DcR2 (B) in MEFs of the indicated genotypes after infection with a vector expressing RasV12 (*Ras*) or an empty vector (V). Ectopic Ras expression is also shown as a control. C, immunofluorescence analysis of endogenous p19 ARF (left panel) and p53 (right panel) in MEFs of the wild-type (wt) and *g/g* genotype after infection with a vector expressing RasV12 (*Ras*) or an empty vector (V). The data shown correspond to day 6 after the end of selection, similar results were obtained at other time points. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

immortalization at a rate indistinguishable from wild-type MEFs (supplemental Fig. 3). Also, apoptosis triggered by DNA damage or other stimuli in thymocytes is not affected by *Ing1* status (supplemental Fig. 4). To understand the molecular basis of the impaired senescent response to Ras, we analyzed by Western blot the levels of several proteins involved in Ras-induced cellular senescence. The antiproliferative response elicited by Ras in mouse fibroblasts is typically accompanied by an accumulation of the p53 protein, which is mediated by the up-regulation of p19 ARF (26). Notably, the expression of RasV12 in *g/g* MEFs failed to provoke an increase of p53 protein levels at the same extent as wild-type cells (Fig. 3A), reflecting a defect in accumulation of p53 upon oncogenic stress. Basal p19 ARF levels were increased in *g/g* cells, most likely due to their higher population doubling number. Nevertheless, p19 ARF induction by Ras was similar to wild-type cells, suggesting that the signaling machinery linking oncogenic

stress with ARF activation is not affected by the suppression of p33 ING1. Likewise, induction of the other product of the *Ink4a/ARF* locus, p16 INK4a, was observed irrespective of the presence of *Ing1*. p21 CIP1 protein levels were also increased in Ras-infected wild-type cells, as described previously, and no obvious difference was observed in *g/g* cells (Fig. 3B). The observed induction of p21 CIP1 in both genotypes, irrespective of arrest induction, most likely reflects a p53-independent effect of Ras expression on p21 protein levels (29)⁵ and is in accordance with previous observations indicating a nonessential role for p21 CIP1 in oncogene-induced senescence (30, 31). Notably, the senescence marker and p53 target DcR2 (32) was not induced significantly by Ras in *g/g* fibroblasts, further supporting a defect in the implementation of senescence and in p53 activity in these cells.

Immunofluorescence experiments using antibodies against p19 ARF and p53 confirmed the results of the Western blot analysis regarding the levels of both proteins. They also showed that *Ing1* status did not affect the subcellular localization of either protein in the presence or absence of oncogenic stress (Fig. 3C).

Impact on p53 Regulation—We decided to investigate the basis of the defective accumulation of p53 observed upon expression of oncogenic Ras. It has been proposed that

p33 ING1 can contribute to p53 activity, both by increasing p53 protein stability (4) and by favoring the acetylation of specific lysine residues in the C terminus of the p53 protein (6). With this background, we first investigated whether the differences in p53 accumulation might reflect differences in basal protein stability. With this purpose, we measured the half-life of the p53 protein in MEFs of both genotypes by Western blot at different time points after inhibition of protein synthesis with cycloheximide. As shown in Fig. 4, A and B, the half-life of p53 protein appeared significantly reduced in *g/g* cells. Different members of the ING family, including p33 ING1, have been shown to increase acetylation of p53 when overexpressed (5, 6). To determine whether *Ing1* could play a role in p53 acetylation *in vivo*, we investigated the degree of p53 acetylation after exposure to

⁵ M. Abad, C. Menéndez, L. González, A. Füchtbauer, M. Serrano, E.-M. Füchtbauer, and I. Palmero, unpublished observations.

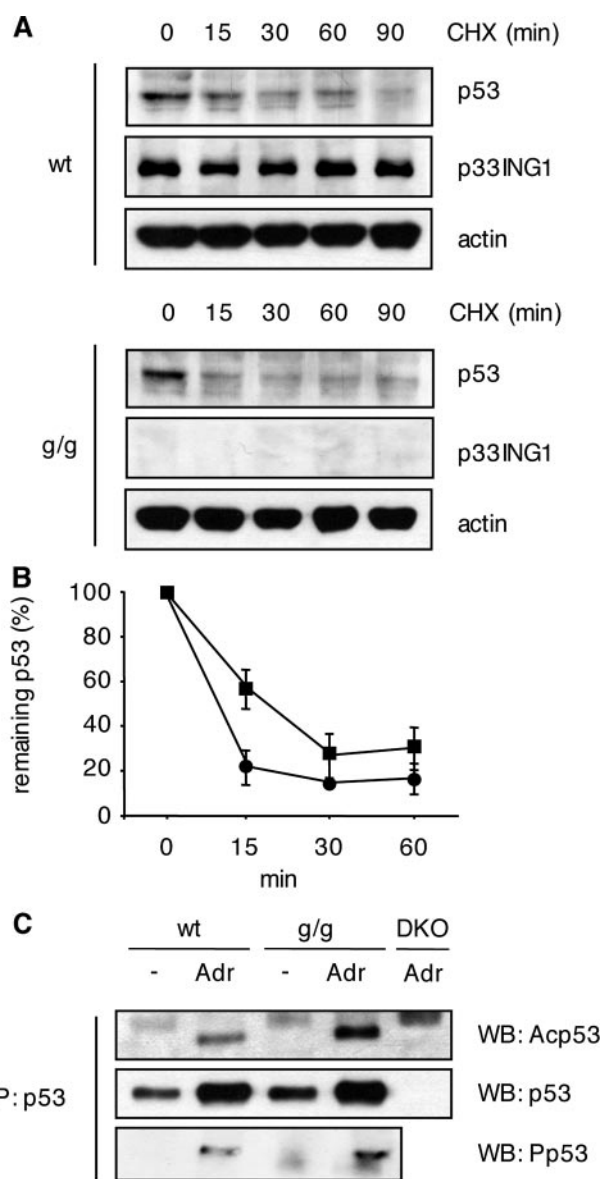


FIGURE 4. p53 regulation in g/g cells. *A*, turnover of p53 protein in wild-type (wt) and g/g fibroblasts was analyzed by Western blot of lysates prepared at the indicated times after addition of cycloheximide (CHX). *B*, quantitation of p53 turnover from scans of Western blots as shown in *A*. Data shown are the average and standard deviation of three independent experiments. Filled squares represent wild-type cells and filled circles g/g cells. *C*, acetylation of p53 after adriamycin treatment (Adr, 0.2 μ g/ml, 4 h), or in untreated controls (–) was analyzed by immunoprecipitation (IP) with anti-p53 antibody followed by Western blot (WB) with an antibody against acetylated p53. The same blot was subsequently incubated with an antibody against p53. MEFs double knock-out for p53 and Mdm2 (DKO) treated with adriamycin were used as a negative control. Phosphorylated p53 was detected by Western blot on CM5 p53 immunoprecipitates using a specific antibody against p53 phosphorylated in Ser-15.

the genotoxic drug adriamycin, a stimulus known to trigger robust acetylation of p53 (33) (Fig. 4C and data not shown). Using immunoprecipitation followed by Western blot with two commercial acetylation-specific antibodies, we could detect acetylated p53 with a comparable intensity in samples both from wild-type and *Ing1* g/g MEFs treated with adriamycin. Similarly, Western blot with an antibody against serine 15-phosphorylated p53 gave indistinguishable results in both genotypes (Fig. 4C). These results support a role for *Ing1* in

control of p53 stability, although they rule out a significant role of *Ing1* products in control of p53 post-translational modification in this setting.

Chromatin Changes during Ras-induced Senescence—The implementation of cellular senescence in human primary fibroblasts, either triggered by oncogenic stress or by the accumulation of population doublings, involves changes in chromatin structure, with the appearance of heterochromatin domains linked to specific gene silencing (34, 35). Taking into account the participation of p33ING1 in the control of histone modifications and chromatin structure, and prompted by the defects in Ras-induced arrest observed in *Ing1*-deficient MEFs, we studied the changes in chromatin structure after RasV12 infection in MEFs of normal and mutant genotypes. With this aim, we carried out immunofluorescence experiments with antibodies against histone 3 trimethylated in Lys-9 (H3K9) or HP1 γ as markers of heterochromatin. The nuclear distribution of either of the heterochromatic marks studied was not overtly changed by RasV12 expression in cells of either genotype. However, when we quantitated the fluorescence intensity in individual nuclei (see Experimental Procedures), we observed a significant increase in H3K9 and HP1 γ signals per nucleus in wild-type MEFs infected with RasV12 retroviruses, relative to vector-infected cells (Fig. 5, *A* and *B*). When we analyzed both markers in Ras-infected g/g fibroblasts, we observed an increase in H3K9 signal, which was indistinguishable to wild-type cells. However, HP1 γ staining in g/g cells remained unchanged after Ras infection (Fig. 5, *A* and *B*). Also, when the fluorescence signals for H3K9 and HP1 γ were simultaneously scored for individual nuclei, we observed that expression of RasV12 translates in a clear correlation for both markers in wild-type cells, but this correlation was not observed in homozygous *Ing1* gene trap MEFs (Fig. 5C). Taken together, these results suggest a role for *Ing1* in HP1 binding to chromatin and presumably heterochromatin formation during Ras-induced senescence in mouse fibroblasts.

DISCUSSION

The role of the family of ING proteins in tumor protection has recently attracted a substantial amount of interest. Biochemical evidence supports their connection to the p53 pathway and their participation in multiprotein complexes with chromatin modification activities. Thus, ING proteins might represent an important link between p53-mediated responses and chromatin regulation. In this study, we have taken a genetic approach to investigate the physiological role of the murine *Ing1* locus in cellular stress responses associated with tumor suppression, using primary embryonic fibroblasts genetically deficient for the products of the *Ing1* locus. Our results identify a critical role of the *Ing1* locus in the antiproliferative response to oncogenic stress. *Ing1*-deficient MEFs display a defective senescence-like phenotype in response to an activated Ras oncogene, as evidenced by their growth rate, BrdUrd incorporation, cell morphology, senescence-associated β -galactosidase staining, p53 accumulation, and heterochromatin formation. The impact of *Ing1* deficiency appears to be specific for the implementation of senescence against activated oncogenes, because other p53-mediated phenotypes are not affected in our

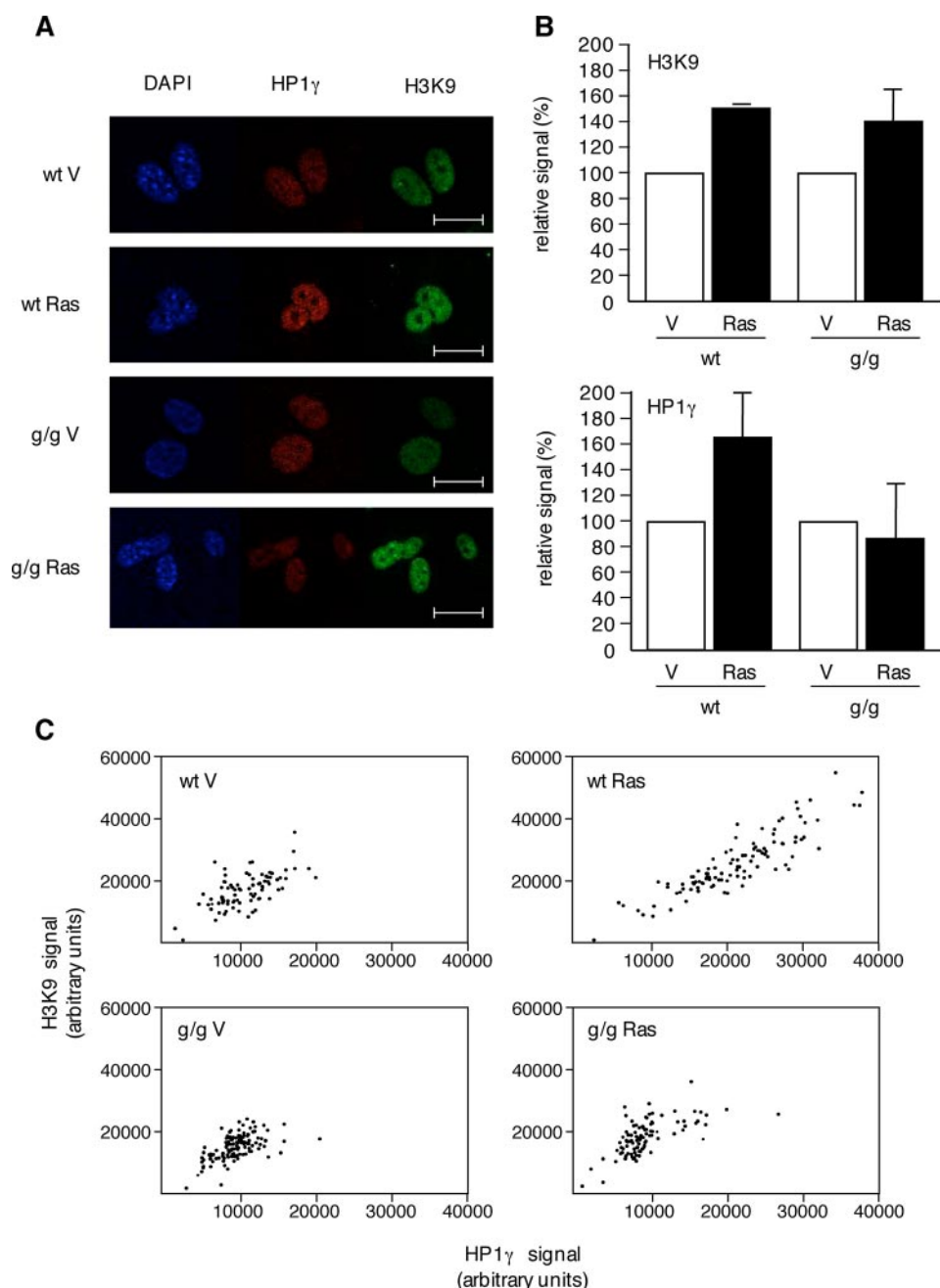


FIGURE 5. Changes in chromatin in Ras-expressing fibroblasts. A, immunofluorescence with antibodies against histone 3 trimethylated in lysine 9 (H3K9) and HP1 γ of both genotypes after retroviral infection with RasV12 (Ras) or an empty vector (V). 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining is shown to identify nuclei. B, quantification of immunofluorescence intensity for H3K9 (upper panel) and HP1 γ (lower panel). The data represent the average of three independent measurements. C, fluorescence intensity of H3K9 and HP1 γ in individual nuclei in g/g and wild-type (wt) MEFs after infection with empty vector (V) or a vector expressing RasV12 (Ras). Each dot corresponds to one individual nucleus. A representative experiment is shown. Scale bars, 20 μ m.

system, in agreement with observations in a different animal model of *Ing1* loss of function (36). A role for *ING1* as a regulator of p53 function has been suggested previously, based on overexpression experiments. Here we show that the accumulation of p53 triggered by oncogenic stress is reduced in *Ing1*-deficient cells. Trying to identify the molecular basis for this defect, we have observed that the basal stability of the p53 protein in stress-free conditions is significantly decreased in *Ing1*-deficient fibroblasts. This effect could reflect a direct role on p53 stabilization, through the disruption of the binding of

Mdm2 to p53, as proposed by Leung *et al.* (4), although indirect effects of *ING1* are also possible. On the other hand, acetylation or phosphorylation of p53 upon DNA damage do not seem to be affected by *Ing1* status in our experiments. It should be noted that conflicting results have been reported so far regarding the participation of p33 *ING1* in p53 acetylation, based in overexpression experiments (see for example Kataoka *et al.* (6) as evidence in favor but also Nagashima *et al.* (5) as evidence against). Other *ING* proteins have been shown to induce p53 acetylation in similar *in vitro* assays, and a possible compensatory effect could be invoked. In particular, there is strong evidence supporting a role for *ING2* in p53 acetylation in different settings (5, 18). *Ing2* RNA is expressed at detectable levels both in WT and g/g MEFs, and it might compensate for *Ing1* deficiency. On the other hand, it is also possible that different *ING* proteins participate in p53 acetylation in response to different stimuli, and we cannot formally rule out such a role for *Ing1* in settings or cell types different from the ones tested here. It should be noted that we have not been able to detect p53 acetylation upon Ras expression in MEFs of either genotype (data not shown), so that we cannot exclude the existence of altered p53 modifications in this setting, in addition to the observed differences in protein levels. After submission of our manuscript, Coles *et al.* (37) have reported the apparently normal response to oncogenic Ras of fibroblasts from an independently generated murine model of deficiency in the *Ing1* locus. Although at this stage we cannot provide an explanation for the apparent discrepancy with our results, it is worth noting that the above-mentioned model differs from ours in the expression of specific *Ing1* products. Although our cells showed no expression of the *Ing1c*-specific transcript and reduced *Ing1b* expression (Fig. 1), normal expression of the *Ing1c* product and no *Ing1b* was reported by Coles *et al.* (37). Although other experimental differences might also be considered, it is tempting to speculate that the reported differences might reflect differential functions of *Ing1* products in the response to oncogenic stress.

The participation of ING1 and other ING proteins in the establishment and recognition of specific histone marks is well established. Our observation of a defective Ras-induced arrest in g/g mouse fibroblasts, a response where chromatin changes have been reported, led us to study the possible contribution of the products of the *Ing1* locus to the formation of heterochromatin in this setting. We have shown that Ras expression in wild-type MEFs causes an apparent increase in heterochromatin, as evidenced by the concomitant increase in the intensity of two heterochromatin marks, namely histone H3 methylated in Lys-9 (H3K9) and the heterochromatin protein HP1 γ , in a similar scenario to human primary fibroblasts (34). *Ing1* deficiency resulted in defective accumulation of HP1 and uncoupling of H3K9 and HP1 signals, which could be explained by a role for p33 ING1 in targeting HP1 proteins to H3K9 sites. The recruitment of HP1 proteins to H3K9 sites is considered an important step for heterochromatin formation and maintenance (38). Therefore, we reasoned that the uncoupling between H3K9 and HP1 observed in *Ing1*-deficient cells should translate in defective heterochromatinization, which paralleled a defective antiproliferative response. Although the chromatin defects observed might reflect indirect effects of *Ing1* depletion in the implementation of senescence, the solid evidence linking ING1 to chromatin regulation clearly supports the participation of *Ing1* in chromatin changes as the most likely mechanism. Interestingly, it has been proposed previously that p33 ING1 could play a role in HP1 deposition during formation of nascent constitutive heterochromatin (39). One possible explanation for our observation is linked to the reported ability of p33 ING1 to modulate histone acetylation (7, 9, 39). There is clear pharmacological and genetic evidence indicating that histone deacetylation is needed for the tethering of HP1 proteins to chromatin (40–43). Although we have not measured directly histone acetylation in our cells, it is feasible that *Ing1* deficiency impairs HP1 binding and heterochromatin formation during Ras-induced arrest as a consequence of its action on histone acetylation. Regardless of the precise mechanism, our results with *Ing1*-deficient cells show a clear correlation between defective Ras-induced arrest and impaired chromatin changes, and they highlight the importance of heterochromatin formation during Ras-induced senescence in mouse cells, in an analogous manner to the phenomenon described in human fibroblasts. In support of this notion, Braig *et al.* (35) have recently shown that the induction of oncogene-induced senescence in premalignant lesions in mice is impaired in animals genetically null for the histone methyltransferase Suv39h1.

To summarize, in this study we provide data that support a dual role for the *Ing1* locus as a mediator of the antiproliferative response elicited by oncogenic stress, first as an upstream regulator of p53, presumably favoring p53 protein stability, and second as a mediator in chromatin regulation, contributing to heterochromatin formation. It will be of interest to determine the possible interplay between both levels of action and their relative contribution to the biological function of *Ing1*. Finally, our results may have important implications to understand the significance of ING1 alterations in human tumors. Although some cases of point mutations or homozygous deletion have been reported, the large majority of tumor-associated alter-

ations of the ING1 locus involves reduced RNA and/or protein levels of p33 ING1 (19), in a situation similar to our cellular system. This study provides a possible explanation for the growth advantage for low p33 ING1-expressing cells, because it predicts that a significant reduction in p33 ING1 function should translate in a defective activation of protective responses to activated oncogenes, weakening tumor protection barriers, and contributing to tumor formation.

Acknowledgments—We are grateful to Manuel Izquierdo for help in experiments with thymocytes, to Juan Carlos Lacal for gift of reagents, and to Esther Martin Garrido for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004) *Nature* **432**, 307–315
2. Shi, X., and Gozani, O. (2005) *J. Cell. Biochem.* **96**, 1127–1136
3. Russell, M., Berardi, P., Gong, W., and Riabowol, K. (2006) *Exp. Cell Res.* **312**, 951–961
4. Leung, K. M., Po, L. S., Tsang, F. C., Siu, W. Y., Lau, A., Ho, H. T., and Poon, R. Y. (2002) *Cancer Res.* **62**, 4890–4893
5. Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedoux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowol, K., and Harris, C. C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9671–9676
6. Kataoka, H., Bonnefin, P., Vieyra, D., Feng, X., Hara, Y., Miura, Y., Joh, T., Nakabayashi, H., Vaziri, H., Harris, C. C., and Riabowol, K. (2003) *Cancer Res.* **63**, 5785–5792
7. Vieyra, D., Loewith, R., Scott, M., Bonnefin, P., Boisvert, F. M., Cheema, P., Pastryeva, S., Meijer, M., Johnston, R. N., Bazett-Jones, D. P., McMahon, S., Cole, M. D., Young, D., and Riabowol, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29832–29839
8. Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 835–848
9. Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A. J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., Yang, X. J., and Cote, J. (2006) *Mol. Cell* **21**, 51–64
10. Shi, X., Hong, T., Walter, K. L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M. R., Lacoste, N., Cayrou, C., Davrazou, F., Saha, A., Cairns, B. R., Ayer, D. E., Kutateladze, T. G., Shi, Y., Cote, J., Chua, K. F., and Gozani, O. (2006) *Nature* **442**, 96–99
11. Palacios, A., Garcia, P., Padro, D., Lopez-Hernandez, E., Martin, I., and Blanco, F. J. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 6903–6908
12. Pena, P. V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K. L., Verkhusha, V. V., Gozani, O., Zhao, R., and Kutateladze, T. G. (2006) *Nature* **442**, 100–103
13. Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., and Wysocka, J. (2007) *Mol. Cell* **25**, 15–30
14. Gonzalez, L., Freije, J. M., Cal, S., Lopez-Otin, C., Serrano, M., and Palmero, I. (2006) *Oncogene* **25**, 5173–5179
15. Cheung, K. J., Jr., and Li, G. (2002) *Exp. Cell Res.* **279**, 291–298
16. Gozani, O., Karuman, P., Jones, D. R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A. A., Baird, C. L., Zhu, H., Field, S. J., Lessnick, S. L., Villasenor, J., Mehrotra, B., Chen, J., Rao, V. R., Brugge, J. S., Ferguson, C. G., Payrastre, B., Myszk, D. G., Cantley, L. C., Wagner, G., Divecha, N., Prestwich, G. D., and Yuan, J. (2003) *Cell* **114**, 99–111
17. Goeman, F., Thormeyer, D., Abad, M., Serrano, M., Schmidt, O., Palmero, I., and Baniahmad, A. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 422–431
18. Pedoux, R., Sengupta, S., Shen, J. C., Demidov, O. N., Saito, S., Onogi, H., Kumamoto, K., Wincovitch, S., Garfield, S. H., McMenamin, M., Nagashima, M., Grossman, S. R., Appella, E., and Harris, C. C. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6639–6648
19. Nouman, G. S., Anderson, J. J., Lunec, J., and Angus, B. (2003) *J. Clin. Pathol.* **56**, 491–496
20. Garkavtsev, I., Kozin, S. V., Chernova, O., Xu, L., Winkler, F., Brown, E., Barnett, G. H., and Jain, R. K. (2004) *Nature* **428**, 328–332
21. Hansen, J., Floss, T., Van Sloun, P., Fuchtbauer, E. M., Vauti, F., Arnold, H. H., Schnutgen, F., Wurst, W., von Melchner, H., and Ruiz, P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9918–9922
22. Palmero, I., and Serrano, M. (2001) *Methods Enzymol.* **333**, 247–256

23. Palmero, I., Murga, M., Zubiaga, A., and Serrano, M. (2002) *Oncogene* **21**, 2939–2947
24. Zeremski, M., Hill, J. E., Kwek, S. S., Grigorian, I. A., Gurova, K. V., Garkavtsev, I. V., Diatchenko, L., Koonin, E. V., and Gudkov, A. V. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32172–32181
25. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) *Cell* **88**, 593–602
26. Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998) *Nature* **395**, 125–126
27. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S. W. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2015–2027
28. Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000) *Nature* **406**, 207–210
29. Kivinen, L., Tsubari, M., Haapajarvi, T., Datto, M. B., Wang, X. F., and Laiho, M. (1999) *Oncogene* **18**, 6252–6261
30. Pantoja, C., and Serrano, M. (1999) *Oncogene* **18**, 4974–4982
31. Groth, A., Weber, J. D., Willumsen, B. M., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27473–27480
32. Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., and Serrano, M. (2005) *Nature* **436**, 642
33. Bode, A. M., and Dong, Z. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 793–805
34. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) *Cell* **113**, 703–716
35. Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005) *Nature* **436**, 660–665
36. Kichina, J. V., Zeremski, M., Aris, L., Gurova, K. V., Walker, E., Franks, R., Nikitin, A. Y., Kiyokawa, H., and Gudkov, A. V. (2006) *Oncogene* **25**, 857–866
37. Coles, A. H., Liang, H., Zhu, Z., Marfella, C. G., Kang, J., Imbalzano, A. N., and Jones, S. N. (2007) *Cancer Res.* **67**, 2054–2061
38. Maison, C., and Almouzni, G. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 296–304
39. Xin, H., Yoon, H. G., Singh, P. B., Wong, J., and Qin, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9539–9546
40. Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J. P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. (2002) *Nat. Genet.* **30**, 329–334
41. David, G., Turner, G. M., Yao, Y., Protopopov, A., and DePinho, R. A. (2003) *Genes Dev.* **17**, 2396–2405
42. Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 490–496
43. Dannenberg, J. H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W. H., and Depinho, R. A. (2005) *Genes Dev.* **19**, 1581–1595